

ЛЬВІВСЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ім. ІВАНА ФРАНКА

На правах рукопису

ГОРИНЬ

ОКСАНА ВАСИЛІВНА

**ХОЛІНЕРГІЧНА РЕГУЛЯЦІЯ ДЕЯКИХ ПОКАЗНИКІВ
ЕНЕРГЕТИЧНОГО І ВУГЛЕВОДНОГО ОБМІНІВ В
ІЗОЛЬОВАНІЙ ПЕРФУЗОВАНІЙ ПЕЧІНЦІ ЩУРА**

03.00.13 - фізіологія людини і тварин

Автореферат

дисертації на здобуття наукового ступеня

кандидата біологічних наук

Львів - 1996

Львівський державний університет ім. Івана Франка
АН УРСР



00752563 (S)

Дисерт

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

Наукові керівники:

доктор медичних наук, професор,
академік АН ВШУ Шостаковська І.В.
доктор біологічних наук Доліба М.М.

Офіційні опоненти:

доктор біологічних наук, професор,
заслужений діяч науки України Стояновський С.В.
кандидат біологічних наук, доцент Чайка Я.П.
Провідна установа - Київський національний університет
ім.Т.Г.Шевченка, науково-дослідний інститут фізіології.

Захист дисертації відбудеться "9" жовтня 1996р. о 13 год.
на засіданні спеціалізованої вченої ради К.04.04.09 з біологічних наук при Львівському державному університеті ім.І.Франка.

Адреса: 290005, Львів-5, вул.Грушевського,4.

З дисертацією можна ознайомитись у бібліотеці Львівського державного університету ім.І.Франка

Автореферат розіслано "7" вересня 1996 р.

Вчений секретар

спеціалізованої ради К.04.04.09

кандидат біологічних наук

Градюк М.В.

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність проблеми. Вивчення механізмів регуляції енергетичного та вуглеводного обмінів на клітинному і субклітинному рівнях залишається однією з найактуальніших проблем фізіології.

Вважається доведеним, що холінергічні регуляторні механізми посідають центральне місце у діяльності секреторних органів (Павлов, 1952; Бабкин, 1960; Склярів, 1965; Скажун, Саратинів, 1977 та ін.). Збуджуючи секрецію, холінергічний медіатор - ацетилхолін (АХ) запускає пластичний обмін, який потребує енергетичного забезпечення (Davis, Lazarus, 1976; Елаєв, 1978; Oberg, Robinovitch, 1980; Шостаковська, Дубицький, 1984).

Дослідженнями І.В.Шостаковської та співавторів встановлений стимулюючий вплив АХ на окисне фосфорилування у мітохондріях (МХ), що полягає в істотному підвищенні швидкості окислення α -кетоглутарату (α -КГ) (Шостаковська, Долиба, Гордій, 1986; Шостаковська, Долиба, 1989). Енергетичне перетворення α -КГ функціонально пов'язане з утворенням РТФ (Jajraul, 1983; Kondrashova, Doliba, 1989). РТФ необхідний для енергетичного забезпечення індукованих АХ синтесів глікогену (Shimazu, 1971), нуклеїнових кислот, фосфоліпідів і білків (Szostakowska, 1965; Елаєв, 1978; Дубицький, Шостаковська, 1984).

Вплив АХ на енергетичний обмін виявляється в активації трансмінази (Демин, 1967; Нілова, 1973; Елаєв, 1978), що може бути істотним фактором підвищення ступеня забезпечення енергетичних процесів (Кондрашова, 1989, 1991; Шостаковська 1968, 1992; Гордій, Долиба, Мурашук, 1985; Долиба, 1986), а також процесів глюконеогенезу шляхом постачання додаткової кількості субстратів (Мак-Мурей, 1980; De Rosa, Swick, 1975).

ЛНБ ім. В. Стефаніка
АН України

Ролі парасимпатичних нервів у регуляції вуглеводного обміну в печінці присвячено менше уваги, ніж ролі симпатичної нервової системи (Yamaguchi, 1991). Зокрема, невідомою залишається їх роль в регуляції енергетичного забезпечення синтезу глюкози у процесі глікоконезогенезу.

Окремі дослідження проведені на цілісному організмі за умов стимуляції блукаючого нерва, або введення АХ. У цьому випадку ефект АХ може опосередковуватись через багато нейрогуморальних ланок всього організму. Так, відомо, що АХ стимулює вивільнення катехоламінів із мозкового шару наднирників (Greenberg, 1982), звільнення інсуліну із β -клітин підшлункової залози (Lundquist, 1982) тощо. З метою вилучення цих впливів ми дослідили вплив АХ на енергетичний обмін та глікоконезогенез в ізольованій печінці щура.

Мета і завдання дослідження. Метою даної роботи було вивчити на субклітинному й органному рівнях зміни деяких показників енергетичного та вуглеводного обмінів у печінці щура при активації холінергічного впливу на ізольовану печінку введенням АХ у перфузійній розчин; з'ясувати значення регуляторного впливу холінергічних механізмів на синтез глюкози і глікогену, а також на клітинну енергетику за умов стимуляції глікоконезогенезу. Висувалось завдання: вивчити вплив АХ у різних концентраціях на дихання й окисне фосфорилування у МХ виділених з ізольованої печінки; визначити залежність величини ефекту АХ на агадані показники від часу експозиції медіатора; встановити вплив АХ на утворення глюкози з лактату і пірувату та вміст глікогену в ізольованій печінці щура; дослідити зміни швидкості поглинання кисню ізольованою печінкою щура за умов стимуляції глікоконезогенезу та введення АХ; з'ясувати роль М-холінорецепторів у реалізації дії введеного АХ на глікоконезогенез; в'яснити вплив АХ на

активність ферментів переамінування в ізольованій печінці щура при стимуляції глюконеогенезу ; дослідити зміни вмісту аденілових нуклеотидів та співвідношення піруват/лактат в ізольованій перфузованій печінці щура за умов стимуляції глюконеогенезу.

Наукова новизна. Вперше на ізольованому органі показано, що АХ стимулює дихання та окисне фосфорилювання у мітохондріях печінки шляхом активації окислення α -кетоглутарату з одночасним підвищенням спряженості дихання і фосфорилювання, активує окислення сукцинату та сумішей глутамату з малатом і пірувату з малатом. Ефекти АХ залежать від дози та часу експозиції медіатора. На ізольованій печінці виявлено стимулюючий вплив АХ на глюконеогенез і синтез глікогену, який реалізується через М-холінерецептори. За умов стимуляції глюконеогенезу АХ призводить до зростання рівня АТФ у тканині ізольованої печінки. Вперше встановлено, що АХ за умов стимуляції глюконеогенезу активує аланін- та аспартатамінотрансферази, забезпечуючи потік субстратів для глюконеогенезу та синтезу додаткового α -кетоглутарату для окислення у циклі трикарбонових кислот. Виявлено підвищення активності сукцинатдегідрогенази під впливом АХ за умов стимуляції глюконеогенезу. Вперше показано, що АХ збільшує швидкість поглинання кисню ізольованою печінкою щура, і цей ефект має тісний позитивний кореляційний зв'язок із продукцією глюкози.

Науково-практична цінність роботи. Результати досліджень розширюють уявлення про механізм регуляторної дії нейротрансмітера ацетилхоліну на енергетичний та вуглеводний обмін. Виявлені особливості впливу АХ на дихання, окисне фосфорилювання і глюконеогенез в печінці, що полягають у підвищенні ефективності спряження дихання при окисленні α -КГ і в стимуляції синтезу глюкози з лактату і пірувату, можуть стати теоретичним обґрунтуванням для медико-клінічних

досліджень з метою розробки методів корекції енергетичного та вуглеводного обмінів. Дані про стимулюючий вплив холіноміметиків на синтез глюкози дадуть можливість рекомендувати ці речовини як такі, що підтримують гомеостаз глюкози після фізичного навантаження.

Апробація роботи. Веручи за основу матеріали дисертації, автор зробила доповіді: на II з'їзді фізіологів Західного регіону України (1993 р., Львів) ; на XIV з'їзді Українського фізіологічного товариства (1994 р., Львів-Київ), на 9-й європейській біоенергетичній конференції (серпень 1996 р., Льеж, Бельгія), щорічних наукових конференціях Львівського університету (1990-1992 рр., 1995-1996 рр., Львів), на наукових семінарах кафедри фізіології людини і тварин Львівського університету (1990р., 1995р., 1996р.) .

Матеріали дисертації висвітлені у дев'яти публікаціях.

Структура дисертації. Дисертація складається зі вступу, огляду літератури, опису методів досліджень та отриманих результатів, їх обговорення, висновків і списку літератури. Робота викладена на 125 сторінках, має 4 таблиці та 17 рисунків.

Декларація особистого внеску дисертанта. Дослідження виконане дисертантом повністю і самостійно. Аналіз отриманих результатів проведено спільно з науковими керівниками.

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

Досліди проведені на тримісячних самцях білих лабораторних щурів масою 200-220 г. З метою моделювання холінергічного впливу на ізольовану печінку використовували ацетилхолінхлорид (АХ).

Для характеристики енергетичного і вуглеводного обмінів дослідження проводили за такою схемою:

- з метою вивчення холінергічного впливу на дихання й окисне

фосфорилування в ізольованій печінки виділялись мітохондрії (МХ) і проводилась полярографічна реєстрація їх дихання у різних станах за Чансом. Для цього ізольовану печінку 30 хв попередньо промивали розчином Krebs-Генселейт, потім у перфузат вводився АХ у різних концентраціях ($5 \times 10^{-8} \text{M}$; 10^{-7}M ; $5 \times 10^{-7} \text{M}$; 10^{-5}M) упродовж 10 і 15 хв. Як субстрати окислення використовували α -кетоглутарат, сукцинат, суміші малату з глутаматом та малату з піруватом;

- для оцінки впливу холіноміметиків на глікогеногенез проводилось визначення концентрації глюкози у витоку від печінки та глікогену в замороженій у рідкому азоті тканині печінки. Після преперфузії, яка тривала 30 хв. до розчину додавали лактат (5 мМ) і піруват (1 мМ), через 15 хвилин у перфузат вносили АХ і контролювали зміни у концентрації виділеної глюкози, паралельно стежили за змінами швидкості поглинання кисню ізольованою печінкою під дією різних концентрацій АХ. У серії дослідів стосовно змін у концентрації глікогену перфузія медіатором тривала 25 хвилин. Для встановлення специфічної дії введеного у перфузат АХ на синтез глюкози застосовувалась фармакологічна блокада М-холінорецепторів атропіном (доза $5 \times 10^{-4} \text{г/1 г}$ тканини печінки). Щоб встановити походження виділеної у перфузат глюкози, використовували аміноксиацетат (1 мМ) - речовина, яка перериває шлях утворення глюкози з лактату і пірувату;

- для в'яснення регуляторного впливу АХ на енергетичний обмін за умов стимуляції глікогеногенезу вивчали дихання та окисне фосфорилування у МХ, виділених в ізольованій печінки, при додаванні лактату, пірувату, оксалоацетату (субстрати окислення: α -кетоглутарат, сукцинат, суміш малату з піруватом), а також вивчали зміни в концентрації аденілових нуклеотидів, у співвідношенні піруват/лактат, активності сукцинатдегідрогенази та ферментів переамінування.

З метою підсилення впливу АХ використовували інгібітор ацетилхолін-естерази прогерин (доза: $3 \cdot 10^{-4}$ г на 1 г тканини печінки).

Ізольовану печінку перфузували за методом Міллера (Miller, 1973). МХ печінки виділяли методом диференційного центрифугування з урахуванням модифікацій, що максимально забезпечують їх нативний стан (Кондрашова, Григоренко, 1985). Дихання МХ реєстрували полярографічним методом з допомогою відкритого електрода Кларка. Названим методом реєстрували також швидкість поглинання кисню ізольованою печінкою. Вміст білка визначали за Лоупі та сп. (Lowry et al., 1951). Активність аланін- і аспартатамінотрансфераз визначали методом Осадчої (1982). Для визначення активності сукцинатдегідрогенази використовували метод Єценка, Вольського (1982).

Ферментативними аналізами визначали концентрації глюкози (Bergmeyer, Bernt, 1974), глікогену (Keppler, Decker, 1974), пірвату (Bucher et al., 1974), лактату (Honorst, 1974), аденілових нуклеотидів (АТФ, АДФ, АМФ) (Lamhrecht, Tracetshold, 1974) (Methods of enzymatic analysis/ed. H.U.Bergemeyer.- New York: Academic Press, 1974).

Отримані результати аналізували методом варіаційної статистики (Деркач та ін., 1977). Ступінь спряженості між окремими досліджуваними показниками і спрямованість існуючого між ними зв'язку визначали за коефіцієнтом кореляції.

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ

1. Вплив ацетилхоліну в різних концентраціях на глюкозогенез за умов додавання у перфузійний розчин лактату і пірвату. Кількісні методи дослідження глюкозогенезу проводяться переважно на препара-

тах ізольованих органів, здебільшого печінки і нирок, швидкість і характер глікогеногенезу в яких оцінюють за приростом глюкози в присутності різних попередників. Найадекватнішим варіантом цього методу є перфузія ізольованих печінки і нирок внаслідок забезпечення рівномірної оксигенації тканини без порушення цілісності органів (Кендыш, 1985; Tanaka, Chance, Qustorff, 1989).

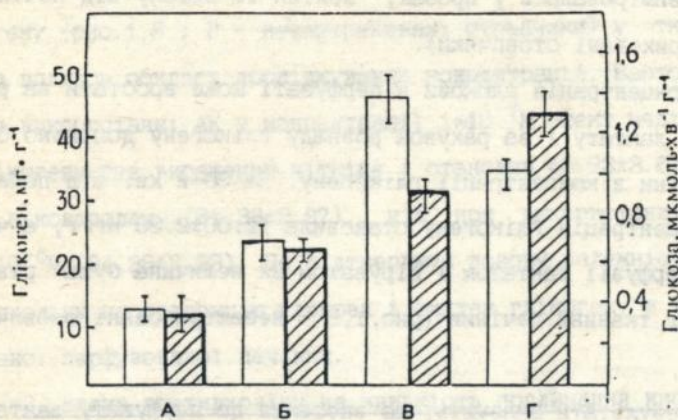


Рис. 1. Вплив АХ в різних концентраціях на вміст глікогену і продукцію глюкози ізольованою печінкою щура.

Умови експерименту: А - перфузія без субстратів, Б- перфузія з лактатом і піруватом, В - лактат+піруват+АХ (10^{-7} М), Г -лактат+піруват+АХ (10^{-6} М) неаштриховані стовпчики - глікоген, аштриховані- глюкоза.

Наші дослідження проводились на ізольованій перфузованій печінці. Як субстрати глікогеногенезу ми використовували лактат і піруват. У перші 30 хв печінка перфузувалась розчином Кребс-Генселейт, без субстратів з метою відмивання органу від залишків крові та біологічно-активних речовин, що діяли на орган в організмі. Крім того, за цей інтервал часу поглинання кисню печінкою виходить на

плато, що засвідчує встановлення певної метаболічної рівноваги. У цей період продукція глюкози становила 0.32 ± 0.08 мк моль/хв*г. На 30-й хв від початку перфузії до розчину додавали лактат і піруват у концентраціях 5мМ і 1мМ відповідно. Через 15 хв це зумовило зростання продукції глюкози печінкою до 0.62 ± 0.06 мк моль/хв*г, концентрація якої вимірювалась у пробах, взятих із витoku від печінки (рис.1,Б - аштриховані стовпчики).

Оскільки концентрація глюкози в перфузаті може зростати за рахунок синтезу з лактату і за рахунок розпаду глікогену доцільно було дослідити зміни в концентрації глікогену. На 30-й хв. від початку перфузії концентрація глікогену становила 12.00 ± 2.33 мг/г, а через 25 хвилин перфузії лактатом і піруватом ця величина була рівна 21.33 ± 2.87 мг/г тканини печінки (рис.1,Б - неаштриховані стовпчики).

Отримані результати вказують, що внесення до перфузату лактату і пірувату стимулює продукцію глюкози печінкою, частина якої депонується у вигляді глікогену, а надлишок звільняється у перфузійний потік, тобто, має місце процес глюконеогенезу спряжений з синтезом глікогену.

Щоб встановити вплив холіноміметиків на процес синтезу в печінці глюкози і глікогену з лактату та пірувату, ми додавали до перфузійного розчину ацетилхолін у різних концентраціях. Результати наших досліджень засвідчують: додавання до перфузату АХ в обидвох концентраціях (10^{-7} М і 10^{-5} М) призводить до збільшення продукції глюкози печінкою (рис.1,В і Г - аштриховані стовпчики).

Зокрема, внесення до перфузату, що містив субстрати глюконеогенезу, АХ (10^{-7} М) призводило до значного збільшення продукції глюкози ізольованою печінкою, яка становила 0.96 ± 0.09 мк моль /1 хв на

1 г тканини. Це на 55% більше, ніж у контролі (перфузія розчином Кребс-Генселейт, що містив лише лактат і піруват). Збільшення концентрації медіатора у 10 разів (10^{-6}M) також зумовило достовірне зростання продукції глюкози ($p < 0.001$), і ця величина становила 1.29 ± 0.10 мк моль/хв*г тканини. Водночас із зростанням концентрації глюкози спостерігалось достовірне ($p < 0.001$) збільшення вмісту глікогену (рис. 1, В і Г - неастриковані стовпчики) у тканині печінки під впливом обидвох досліджуваних концентрацій. Варто зазначити, що при використанні АХ у концентрації $1 \cdot 10^{-7}\text{M}$ ефект медіатора на вміст глікогену був виражений чіткіше і становив 46.23 ± 3.67 мг/г порівняно з контролем (21.33 ± 2.87), ніж при використанні концентрації $1 \cdot 10^{-6}\text{M}$ (34.35 ± 2.33). Це підтверджує дозову залежність ефектів ацетилхоліну на продукцію глюкози і синтез глікогену в тканині ізольованої перфузованої печінки.

2. Вплив ацетилхоліну на швидкість поглинання кисню ізольованою перфузованою печінкою та гемодинаміку за умов стимуляції глюконеогенезу. У праці Танаки і співавторів показано, що додавання до перфузійного розчину суміші лактату і пірувату зумовлює підвищення поглинання кисню ізольованою печінкою щура (Tanaka et al., 1989).

Результати наших досліджень показані на рис. 2, (А, лінія-1). Як бачимо, внесення в перфузат 5 мМ лактату і 1 мМ пірувату після 30 хв перфузії печінки розчином без субстратів призводить до значного зростання швидкості поглинання кисню. Через 10-15 хв швидкість поглинання кисню досягає максимального рівня і становить 182% контрольних величин. Ці дані чітко корелюють із підвищенням продукції глюкози печінкою (А, лінія-2) (коефіцієнт кореляції $r = 0.9911$). Внесення у перфузійний розчин АХ ($1 \cdot 10^{-7}\text{M}$) також зумовлює збільшення швидкості поглинання кисню. Збільшення концентрації АХ до $5 \cdot 10^{-7}\text{M}$

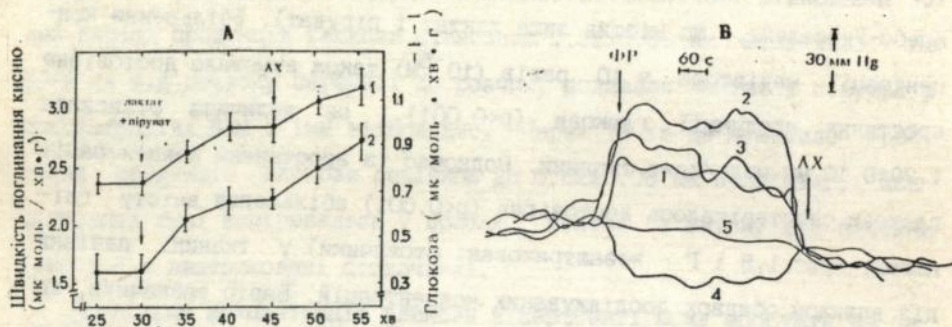


Рис. 2. Вплив АХ на швидкість споживання кисню і продукцію глюкози ізольованою печінкою за умов стимуляції глюконеогенезу.

А: крива 1 - швидкість поглинання кисню,

крива 2 - звільнення глюкози у перфузат.

В: напруженість кисню (запис справа наліво), АХ - ацетилхолін, ФР - фізіологічний розчин, конц. АХ: 1 - $5 \cdot 10^{-8} \text{М}$; 2 - 10^{-7}М ; 3 - $5 \cdot 10^{-7} \text{М}$; 4 - 10^{-6}М ; 5 - атропін + 10^{-6}М .

приводило до зменшення ефекту, а концентрація $1 \cdot 10^{-6} \text{М}$ навіть викликала зниження поглинання кисню (В, лінія-4).

Ми припустили, що зниження поглинання кисню при високій концентрації ацетилхоліну може бути пов'язане з його впливом на гемодинаміку. Результати досліджень засвідчують дозозалежне зниження швидкості перфузії у венозній системі печінки. Поступове збільшення концентрації АХ у 5, 10, 15 разів приводить до зменшення швидкості перфузійного потоку з 46 мл/хв (АХ: $5 \cdot 10^{-8} \text{М}$) до 38.7 мл/хв (АХ: 10^{-6}М). У даному випадку атропін лише частково знімає ефект АХ у концентрації 10^{-6}М . Це засвідчує опосередкування впливу медіатора на швидкість перфузії не лише через М-холінорецептори. Таку дію

ацетилхоліну необхідно брати до уваги при дослідженні біоенергетичних показників. Очевидно, що зниження поглинання кисню при дії АХ у концентрації 10^{-6} М пов'язане із його впливом на гемодинаміку.

3. Усунення стимулюючої дії ацетилхоліну на глюконеогенез амінооксиацетатом. У праці Цедербаума і співавторів (Cederbaum et al., 1973) зазначається, що амінооксиацетат - інгібітор трансаміназних реакцій перериває шлях утворення глюкози з лактату і пірувату. Оскільки в печінці глюкоза може утворюватись внаслідок її синтезу в процесі глюконеогенезу і внаслідок розпаду глікогену, необхідно було в'ясувати походження глюкози, що виділялась у перфузат в умовах нашого дослідження.

На користь того, що зростання концентрації глюкози у витоку із печінки відбувається за рахунок її синтезу в процесі глюконеогенезу, засвідчує такий факт: амінооксиацетат у концентрації 1мМ повністю усуває стимулюючий ефект ацетилхоліну на синтез глюкози. Оскільки в печінці присутні як М-, так і Н-холінорецептори, важливе значення має те, через які саме холінорецептори реалізує свій вплив АХ. Як показали наші дослідження, вплив АХ на синтез глюкози у процесі глюконеогенезу реалізується через М-холінорецептори, оскільки блокада їх атропіном повністю усувала ефект медіатора.

4. Зміни вмісту аденілових нуклеотидів за умови стимуляції глюконеогенезу та співвідношення піруват/лактат в ізольованій перфузованій печінці щура під дією АХ. Як відомо, процес глюконеогенезу потребує значного енергетичного забезпечення (для синтезу 1 молекули глюкози необхідно 4 молекули АТФ). З цим, очевидно, пов'язане зростання гідролізу АТФ при дії АХ, що відображається у зростанні концентрації АДФ і АМФ. Таблиця 1 подає дані про вплив різних доз ацетилхоліну на вміст аденілових нуклеотидів в ізольованій перфузо-

ваній печінці щура. Як бачимо, низька концентрація ацетилхоліну ($1 \times 10^{-7} \text{M}$) призводить до зростання концентрації АТФ на 18% порівняно з контрольними величинами. Водночас достовірно зростає концентрація АДФ на 12% і АМФ на 33%. Очевидно, що поряд з активацією синтезу АТФ має місце й активація його гідролізу. Активація гідролізу АТФ під дією ацетилхоліну, ймовірно, пов'язана із стимуляцією у печінці глікогеногенезу, який, як вже згадувалось, потребує значного енергетичного забезпечення.

Таблиця 1 також показує, що дія ацетилхоліну в концентрації $1 \times 10^{-6} \text{M}$, призводить до достовірного зниження в тканині печінки концентрації АТФ на 33%, а також до зростання концентрації АДФ на 28%, АМФ на 67%, і Фн на 46% стосовно контролю. Таке зниження рівня АТФ, засвідчує насамперед про інтенсивний його гідроліз. Не виключено, що у згаданій концентрації АХ зумовлює зменшення його синтезу.

Важливим фактором регуляції глікогеногенезу є стан редокс-системи. Згідно з дослідженнями Вілл'ямсона Дж.Р. і співавторів (Williamson et al, 1969) співвідношення концентрацій пірувату і лактату (піруват/лактат) може бути відображенням цитоплазматичного співвідношення окисленої та відновленої форми піридиннуклеотидних коферментів ($\text{НАД}^+/\text{НАДН}$).

Результати наших досліджень показують, що концентрація лактату достовірно не змінюється під впливом АХ у концентраціях 10^{-7} - $5 \times 10^{-7} \text{M}$ і підвищується при високій концентрації 10^{-6}M (табл. 1). Концентрація ж пірувату істотно зменшується при всіх досліджуваних дозах АХ, і це приводить до зменшення співвідношення піруват/лактат на 29% при використанні АХ у концентрації 10^{-7}M , на 33% ($\text{АХ } 5 \times 10^{-7} \text{M}$) і на 40% при дії АХ 10^{-6}M . Отже, АХ за умови стимуляції глікогеногене-

Таблиця 1.

Вплив ріаних концентрацій ацетилхоліну на вміст аденілових нуклеотидів і відношення піруват/лактат в ізольованій перфузованій печінці щура.

Умови експерименту	АТФ, мкмоль/г	АДФ, мкмоль/г	АМФ, мкмоль/г	P_n , мм	Піруват, мкмоль/г	Лактат, мкмоль/г	Піруват / лактат
Контроль	2.30±0.26	0.87±0.26	0.45±0.07	3.32±0.31	0.42±0.01	3.04±0.01	0.14±0.003
Ацетилхо- лін, $1 \cdot 10^{-7} M$	2.73±0.15*	0.97±0.04	0.60±0.08*	3.41±0.27	0.29±0.01*	2.96±0.04	0.100±0.004**
Ацетилхо- лін, $5 \cdot 10^{-7} M$	2.25±0.23	0.98±0.06	0.80±0.09**	3.40±0.20	0.27±0.01*	2.86±0.04	0.094±0.003**
Ацетилхо- лін, $1 \cdot 10^{-6} M$	1.73±0.07*	1.11±0.25	0.75±0.13**	4.48±0.81*	0.28±0.04*	3.31±0.06**	0.084±0.009**

Примітка: відношення піруват/лактат вказує на цитоплазматичний стан редокс-системи.

* - $p < 0.02$;

** - $p < 0.01$.

ау в ізолюваній печінці щура зумовлює зсув редокс-потенціалу до відновлених форм, що створює добрі умови для синтезу АТФ шляхом забезпечення потоку електронів у дихальний ланцюг.

5. Регуляція ацетилхоліном дихання й окисного фосфорилювання в мітохондріях, виділених в ізолюваній перфузованій печінки. Оскільки метаболізм глюкози тісно пов'язаний через цикл Кребса з окисним фосфорилюванням, у процесі якого синтежуються макроерги необхідні для забезпечення реакцій гліколизогенезу, ми дослідили вплив АХ на дихання й окисне фосфорилювання в МХ, виділених в ізолюваній печінки, за умов, коли в перфузаті присутня глюкоза (5мм).

Як показали результати, ін'єкція АХ ($10^{-7}M$) призводить до стимуляції швидкості контрольованого, і АДФ-стимульованого дихання при окисленні всіх досліджуваних субстратів. Зокрема, при окисленні α -КГ АХ ($10^{-7}M$) зумовив достовірне зростання швидкості АДФ-стимульованого дихання до 53.89 ± 4.31 нг-ат O_2 /хв*мг білка ($p < 0.001$), водночас у контролі ця величина становила 41.23 ± 2.12 . При використанні сукцинату швидкість АДФ-стимульованого дихання становила у контролі 41.48 ± 3.04 і зростала під впливом АХ до 56.63 ± 4.59 нг-ат O_2 /хв*мг білка. Достовірна зміна цього ж показника спостерігалась при окисленні суміші глутамату з малатом і становила 56.87 ± 5.36 нг-ат O_2 /хв*мг білка, що на 57% вище від контрольних величин (рис.3). Фосфорилювання доданої АДФ проходить значно інтенсивніше при окисленні НАД-залежних субстратів, у даному випадку - α -кетоглутарату і суміші глутамату з малатом. Коефіцієнт інтенсивності окисного фосфорилювання під впливом АХ ($10^{-7}M$) порівняно з контролем зростає на 81% і 57% відповідно, але суттєво не відрізняється від контрольної величини при окисленні сукцинату. Необхідно зазначити достовірне підвищення на 33% ($p < 0.05$) ефективності окисного

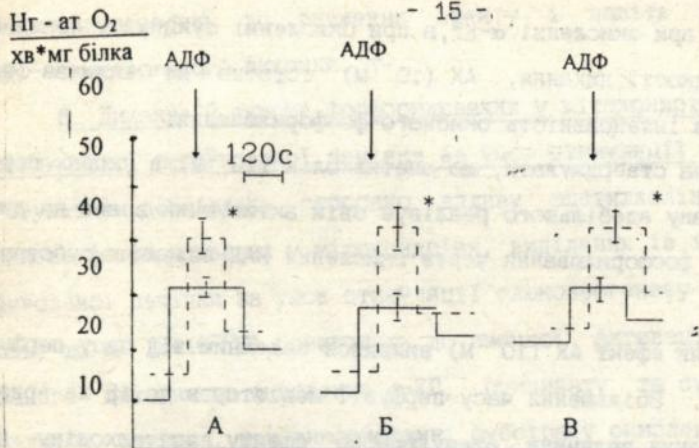


Рис. 3. Дихання й окисне фосфорилування МХ, виділених з ізольованої печінки щура перфузованої АХ (10^{-7} М). Контроль - суцільна лінія; дослід - перервана лінія; субстрати окислення: А - α -КГ; Б - глутамат + малат; В - сукцинат. * - $p < 0.05$.

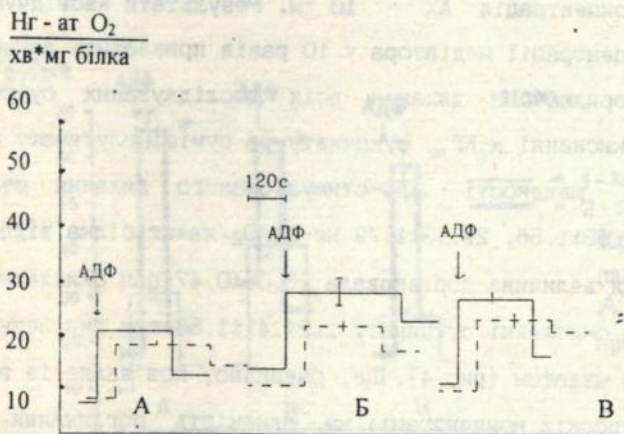


Рис. 4. Дихання й окисне фосфорилування МХ, виділених з ізольованої печінки щура перфузованої АХ (10^{-6} М). Контроль - суцільна лінія; дослід - перервана лінія; субстрати окислення: А - α -КГ; Б - сукцинат; В - глутамат + малат. * - $p < 0.05$.

фосфорилювання при окисненні α -КГ, а при окисненні сукцинату поряд з активацією швидкості дихання, АХ (10^{-7} М) істотно не впливає на ефективність та інтенсивність окисного фосфорилювання.

Отже, можна стверджувати, що ацетилхолін (10^{-7} М) в умовах перфузованого органу здебільшого реалізує свій активуючий вплив на дихання й окисне фосфорилювання через окислення НАД-залежних субстратів.

Стимулюючий ефект АХ (10^{-7} М) виявився залежним від часу перфузії медіатором. Збільшення часу перфузії медіатором до 15 хв призводило до зниження величини стимулюючого ефекту ацетилхоліну на АДФ-стимульоване дихання з 36% на α -кетоглутараті та 42% на сукцинаті до 24% і 6% відповідно.

При дослідженні впливу АХ на дихання й окисне фосфорилювання в ізольованій перфузованій печінці нами також використувувалась відносно висока концентрація АХ - 10^{-6} М. Результати засвідчують, що збільшення концентрації медіатора у 10 разів призводить до зниження швидкості фосфорилюючого дихання всіх досліджуваних субстратів. Зокрема, при окисненні α -КГ, сукцинату та суміші глутамату з малатом величина швидкості АДФ-стимульованого дихання становила 22.50 ± 0.53 , 27.53 ± 1.56 , 29.13 ± 1.79 нг-ат O_2 /хв*мг білка відповідно, а в контролі ця величина дорівнювала 26.05 ± 0.47 при окисненні α -КГ, 36.21 ± 3.52 при окисненні сукцинату і 34.41 ± 1.53 при окисненні суміші глутамату з малатом (рис.4). Це, очевидно, пов'язане із згаданим ефектом АХ у високій концентрації на швидкість поглинання кисню, гемодинаміку та вміст аденілових нуклеотидів у ізольованій печінці щура. Отже, залежно від дози АХ порівняно впливає на дихання й окисне фосфорилювання. Найвишого ефекту можна досягти використовуючи концентрації $5 \cdot 10^{-9}$ М і 10^{-7} М. Збільшення концентрації АХ у 5-10

рагів призводить до зниження ефекту і навіть до гальмування АДФ-стимульованого дихання.

6. Дихання й окисне фосфорилування у мітохондріях, виділених з ізольованої перфузованої печінки за умов стимуляції гліконеогенезу.

Результати досліджень стосовно впливу ацетилхоліну на дихання й окисне фосфорилування у мітохондріях, виділених із ізольованої перфузованої печінки за умов стимуляції гліконеогенезу (рис.5) показують, що АХ ($5 \cdot 10^{-8} \text{M}$) призводить до значної активації АДФ-стимульованого дихання за окислення α -КГ, сукцинату та суміші пірувату з малатом. Зокрема, при використанні субстрату окислення α -КГ величина швидкості АДФ-стимульованого дихання збільшується із 30.29 ± 1.48 у контролі до 65.20 ± 6.54 нг.ат O_2 / мг білка за 1 хв під дією АХ; за окислення сукцинату цей показник змінюється з 38.17 ± 3.17 до 61.18 ± 4.59 , а при використанні суміші пірувату з малатом швидкість

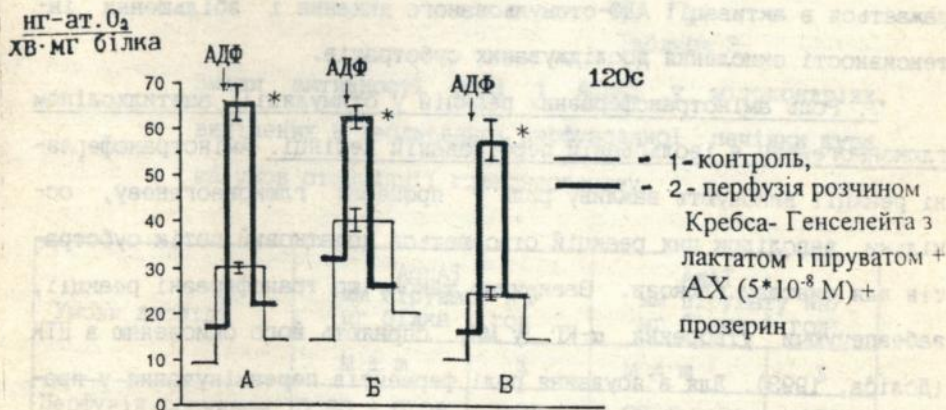


Рис. 5. Дихання й окисне фосфорилування у МХ, виділених з ізольованої перфузованої печінки за умов стимуляції гліконеогенезу.

А - α -КГ; Б - сукцинат; В - піруват + малат; * - $p < 0.05$.

АДФ-стимульованого дихання зростає з 23.06 ± 1.56 до 56.3 ± 5.36 нг-ат O_2 / 1 мг білка за 1 хв. Значно скорочений час фосфорилування доданої АДФ за дії АХ. Це призводить до істотного підвищення інтенсивності окисного фосфорилування (АДФ/t) на 98, 151 і 147% відповідно при окисленні α -КГ, сукцинату та пірувату з малатом. При окисленні α -КГ також спостерігається підвищення ефективності окисного фосфорилування (коефіцієнт АДФ/O у контролі становив 1.90 ± 0.17 , а під дією АХ його величина зростає до 2.5 ± 0.14 , що на 30% більше).

Варто зазначити, що за умов стимуляції глюконеогенезу ацетилхолін активує важливий фермент циклу трикарбонових кислот - сукцинатдегідрогеназу, активність якої порівняно з контролем зростає на 34%.

Отже, за умов стимуляції глюконеогенезу ацетилхолін у концентрації $5 \times 10^{-8} M$ активує процеси дихання й окисного фосфорилування і при окисленні НАД -залежних, і ФАД -залежних субстратів. Це відображається в активації АДФ-стимульованого дихання і збільшення інтенсивності окислення досліджуваних субстратів.

7. Роль амінотрансферазних реакцій у стимуляції ацетилхоліном глюконеогенезу в ізольованій перфузованій печінці. Амінотрансферазні реакції виконують важливу роль у процесах глюконеогенезу, оскільки внаслідок цих реакцій створюється додатковий потік субстратів для синтезу глюкози. Зазначимо також, що трансферазні реакції, забезпечуючи утворення α -КГ у МК, сприяють його окисленню в ЦТК (Доліба, 1993). Для з'ясування ролі ферментів переамінування у процесах глюконеогенезу ми дослідили вплив АХ на активність аланін- та аспаратамінотрансфераз. Результати досліджень показали (табл. 2), що АХ у дозі $5 \times 10^{-8} M$ зумовлює достовірне зростання активності обидвох досліджуваних ферментів переамінування. Якщо у контрольних дос-

лідах активність аспаратамінотрансферази в мітохондріальній фракції, виділеній з ізольованої перфузованої печінки, становила 0.80 ± 0.08 мМ пірвату Na/1мг білка * 1 год., а аланінамінотрансферази 0.32 ± 0.11 мМ пірвату Na/1мг білка * 1 год., то через 15 хв перфузії розчином, що містив ацетилхолін у концентрації $5 \cdot 10^{-8}$ М, в присутності лактату (5мМ), пірвату (1мМ) і оксалоацетату (1мМ) активність згаданих ферментів зростала до 1.30 ± 0.11 і 0.43 ± 0.02 мМ пірвату Na/1мг білка*1 год відповідно в АспАТ і АлАТ. Це становить 162.5% і 134% контрольних величин.

Отже, АХ, активуючи трансамінази, сприяє синтезу глюкози в процесі глюконеогенезу, створюючи додатковий потік субстратів, а також сприяє утворенню ендogenousного α -кетоглутарату, що активує його окислення в ЦТК і забезпечує тим самим синтез АТФ і ГТФ для енергетичного забезпечення глюконеогенезу.

Таблиця 2.

Зміни активності АлАТ і АспАТ у мітохондріях, виділених з ізольованої перфузованої печінки щура за умов стимуляції глюконеогенезу

Умови дослідю	АспАТ мМ пірвату Na/ мг білка·1 год		АлАТ мМ пірвату Na/ мг білка·1 год	
	М \pm m	%	М \pm m	%
Перфузія розчином Кребса-Генселейта	$0,80 \pm 0,08$	100	$0,32 \pm 0,01$	100
Перфузія розчином Кребса-Генселейта+ лактат + пірват+ оксалоацетат + АХ ($5 \cdot 10^{-8}$ М)	$1,30 \pm 0,11^*$	162,5	$0,43 \pm 0,02^*$	134

* - $p < 0,01$.

ВИСНОВКИ

1. Ацетилхолін стимулює синтез глюкози з лактату і пірувату, а також глікогену ізольованою перфузованою печінкою щура із достовірним збільшенням його концентрації у тканині.

2. Стимулюючий вплив введеного у перфузат АХ на глюконеогенез опосередкований через М-холінорецептори, оскільки блокада їх атропіном повністю усуває ефект медіатора.

3. АХ у концентраціях $5 \cdot 10^{-8}$, $1 \cdot 10^{-7}$ і $5 \cdot 10^{-7}$ М збільшує швидкість поглинання кисню ізольованою печінкою за умови стимуляції глюконеогенезу з додаванням до перфузійного розчину пірувату і лактату. Зростання швидкості поглинання кисню за зазначених умов має чітку позитивну кореляцію із продукцією глюкози ізольованою печінкою ($r=0.9911$).

4. АХ у високих концентраціях ($1 \cdot 10^{-6}$ М) знижує швидкість циркуляції в судинній системі печінки, що, ймовірно пов'язане із вагодилатацією судин.

5. У концентрації $1 \cdot 10^{-7}$ М АХ призводить до зростання рівня АТФ у тканині ізольованої печінки поряд із збільшенням концентрацій АМФ і АДФ, що, очевидно, пов'язане із його гідролізом для забезпечення реакцій простимульованого глюконеогенезу.

6. При перфузії ізольованої печінки ацетилхоліном зростає величина окисно-відновного потенціалу до відновлених форм піридиннуклеотидів. Це засвідчує активацію ацетилхоліном аеробного енергетичного обміну за умови стимуляції глюконеогенезу та створення потоку протонів для синтезу АТФ.

7. У МХ ізольованої печінки АХ стимулює дихання та окисне фосфорилування шляхом активації окислення НАД-залежних (α -кетоглутарату, глутамату з малатом, пірувату з малатом), і ФАД-залежних (сук-

цинат) субстратів. При окисленні α -кетоглутарату АХ зумовлює одночасне підвищення інтенсивності та спряженості дихання і фосфорилування. Дія АХ на дихання й окисне фосфорилування залежить від концентрації та часу експозиції медіатора.

8. За умови стимуляції глікогеногенезу АХ підвищує активність ферментів переамінування - аланін- і аспартатамінотрансфераза. Це забезпечує додатковий потік субстратів для синтезу глюкози, а також його адекватне енергетичне забезпечення через утворення ендogenous α -кетоглутарату та його окислення у циклі трикарбонових кислот.

Список публікацій за темою дисертації:

1. Шостаковская И.В., Вабский А.М., Горинь О.В., Долиба Н.М., Музыка Ф.В. Субклеточные механизмы реализации холин- и адренергических влияний в пищеварительных железах и миокарде // Проблемы физиологии гипоталамуса: Межведомств. научн. сб./ Под ред. А.Ф. Коженко и др. - К.: Лыбидь, 1992.-Вып.26.- С.116-122.

2. Шостаковська І.В., Гордій С.К., Долиба М.М., Вабський А.М., Музыка 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.- К.: Либідь, 1992.- С.54-55.

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

4. Долиба М.М., Лакаль Абдула, Ватаманюк М.В., Романик О.В., Кургалюк Н.М. Підвищення спряженості дихання та окисного фосфорилу-

вання мітохондрій за дії ацетилхоліну // Матеріали I-го з'їзду Укр. біофізичн. т-ва, 20-24 черв. 1994р. - К., 1994.- С. 88-89.

5. Долиба М.М., Гордій С.К., Ватаманюк М.З., Горинь О.В. Субклітинні механізми реалізації впливу холіноміметиків на енергетичні процеси в міокарді та травних залозах // XIV з'їзд Укр.фізіолог. т-ва, м.Київ, 1-4 листоп. 1994 р.: Тез доп.- К., 1994.- С.156.

6. Горинь О.В., Долиба М.М., Ватаманюк М.З. Порівняння дії ацетилхоліну на енергетичний обмін в ізольованій перфузованій печінці щура і в умовах *in vivo* // Експериментальна та клінічна фізіологія. Зб. наук. праць.- Львів, 1995.- С.203-204.

7. Горинь О.В., Долиба М.М., Шостаковська І.В. Холінергічна регуляція деяких показників енергетичного обміну в ізольованій перфузованій печінці// Актуальні проблеми медицини, біології, ветеринарії та сільського господарства.- Львів: Віче, 1996.- С.124-129.

8. Горинь О.В., Долиба М.М., Ватаманюк М.З., Шостаковська І.В. Вплив ацетилхоліну на глюконеогенез в ізольованій перфузованій печінці// Бюлетень клінічної та експериментальної фізіології.- Львів: Ескулап, 1996.- т.1.- №1-2.- С.12-16.

9. Goryn O., Doliba M., Shostakovska I. Regulation of respiration and transferase activity by acetylcholin in perfused isolated rat liver under gluconeogenesis stimulation condition// EBEC reports.- 1996.- Vol.9.-P.239.

Горинь О.В. Холинергическая регуляция некоторых показателей энергетического и углеводного обменов в изолированной печени крысы. Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.00.13.- физиология человека и животных.

На ізольованом органі показано, що ацетилхолін стимулює

дыхание и окислительное фосфорилирование в митохондриях печени путем активации окисления α -кетоглутарата с одновременным повышением сопряжения дыхания и фосфорилирования, активирует окисление сукцината и смесей глутамата с малатом и пирувата с малатом. Эффекты ацетилхолина зависят от дозы и времени экспозиции медиатора. Выявлено стимулирующее влияние ацетилхолина на глюконеогенез и синтез гликогена изолированной печени. Продукция глюкозы коррелирует с возрастанием скорости поглощения кислорода. Влияние ацетилхолина на глюконеогенез опосредованно через М-холинорецепторы. В условиях простимулированного глюконеогенеза в ткани печени под влиянием АХ возрастает концентрация АТФ, одновременно увеличиваются концентрации АДФ и АМФ. Ацетилхолин активирует сукцинатдегидрогеназу, а также аланин- и аспаратаминотрансферазы, способствуя увеличению потока субстратов для глюконеогенеза и синтезу эндогенного α -кетоглутарата для окисления в цикле трикарбоновых кислот.

Goryn' O.V. Cholinergic regulation of some indexes of energetic and carbohydrate metabolisms in isolated perfused rat liver. Thesis for Ph.D. degree in biological sciences by speciality: 03.00.13 - Human and animals Physiology. Ivan Franko State University, Lviv, Ukraine, 1996.

It was shown in isolated organ that acetylcholine leads to stimulation of respiration and oxidative phosphorylation in liver mitochondria. Under α -ketoglutarate oxidation simultaneously effectiveness of oxidative phosphorylation increases. Acetylcholine activates of succinate and glutamate-malate and pyruvate-malate mixtures oxidation. Acetylcholine effects dependent on dose and time of mediator influence. It was shown that acetylcholine

stimulates glucose and glycogen synthesis. Glucose production correlates with rate O_2 uptake increase. Acetylcholine influence intermed by M-cholinergic receptors. In liver tissue under gluconeogenesis conditions Ach influence leads to ATP concentration increase at the same time to ADP and AMP concentration increase. Acetylcholin activate succinatedehydrogenase and alanin- and aspartataminotrasferases. This promote substrate flow increase for gluconeogenesis and endogenic α -ketoglutarate synthesis for oxidation in Cycle of tricarbonic acids.

Головні слова: ацетилхолін, глуконеогенез, печінка, мітохондрії, окисне фосфорилування, α -кетоглутарат, сукцинат.

O. Termez

Ав32 Н82
Зам №112. Підписано до друку 4.07.1996 р.

Формат 60x84 1/16. Ум.друк.арк. 1.5 Тираж 100 пр.

Ротопринт Львівської наукової бібліотеки ім.В.Стефаника
НАН України, вул.Лермонтова, 15.

438772

