

УДК 577.15/16:547.262

ПУТИ СИНТЕЗА АЦЕТАЛЬДЕГИДА В УСЛОВИЯХ ИЗБИРАТЕЛЬНОГО ИНГИБИРОВАНИЯ ПИРУВАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ ОКСИТИАМИНОМ

Т.Н. Пыжик, к.б.н., доцент

Кафедра биохимии

УО «Гродненский государственный медицинский университет»

Исследована динамика активности ферментов синтеза ацетальдегида из фосфоэтанолamina и треонина в печени крыс при избирательном ингибировании окситиамином пируватдегидрогеназы.

Ключевые слова: печень, кровь, почки. Эндогенный этанол, ацетальдегид, пируватдегидрогеназа, фосфоэтанолaminлиаза, треонинальдoлаза, окситиамин.

Dynamics of the activity of enzymes of acetaldehyde synthesis from phosphoethanolamine and threonine in the rat liver under selected inhibition of pyruvate dehydrogenase by oxythiamine is discussed in the paper.

Key words: liver, blood, kidneys, endogenous ethanol, acetaldehyde, pyruvate dehydrogenase, phosphoethanolamine lyase, threonine aldolase, oxythiamine.

Растущая проблема злоупотребления алкоголем и алкогольной зависимости снискала внимание общественности и научных кругов. Ряд острых психических реакций, вызванных алкоголем, удовлетворяет классификации, предусмотренной для диагностики химически обусловленных расстройств [3]. Уникальные биохимические свойства этанола, как психоактивного вещества, определяют чувствительность всех систем организма к его уровню. Уязвимость к нарушению нормального функционирования систем синтеза и деградации этанола рассматривается в настоящее время как биологическая составляющая развития алкогольной зависимости. Так, предположение о наличии связи между сбоем системы эндогенный этанол – ацетальдегид врожденного характера и феноменом предпочтительного потребления алкоголя нашло экспериментальное подтверждение [4].

Результаты многочисленных исследований привели к успешному решению ряда важнейших вопросов, касающихся катаболизма экзогенного этанола в организме. Анализ данных литературы последних лет показывает, что в процессы метаболизма этого соединения включены все основные системы организма [1]. Однако попытки дальнейшего терапевтического вмешательства могут, по-видимому, иметь большую надежду на успех при условии, что будут детально изучены источники, обеспечивающие базальный уровень эндогенного этанола и ацетальдегида в физиологических условиях.

Новаторские исследования, проведенные под руководством академика Ю. М. Островского, позволили прийти к выводу о существовании тонких механизмов регуляции метаболизма эндогенного этанола и строгого гомеостатического контроля его уровня самим организмом [4].

Ключевым ферментом, контролирующим равновесие во взаимных превращениях ацетальдегида и этанола в физиологических условиях является алкогольдегидрогеназа. Однако в поддержании стабильного уровня эндогенного этанола роль этого фермента отчасти ограничивается его неспецифичностью и способностью окислять другие спирты, обладающие более высоким сродством к ферменту.

Исследования, предпринятые нами ранее, показали, что продукция эндогенного этанола в печени связана с активностью пируватдегидрогеназы, треонинальдoлазы, фосфоэтанолaminлиазы. Результаты экспериментов с использованием соответствующих субстратов – пирувата, треонина и фосфоэтанолamina – позволили нам сделать предположение о сочетанном изменении активнос-

ти перечисленных ферментов в ответ на указанные воздействия [11]. Вариации активности пируватдегидрогеназы, треонинальдoлазы и фосфоэтанолaminлиазы в опытах с использованием этаноламина в качестве ингибитора альдегиддегидрогеназы подтверждают это предположение [6].

Целью настоящего исследования явилось изучение характера ковариаций между треонинальдoлазой и фосфоэтанолaminлиазой в эксперименте с избирательным ингибированием пируватдегидрогеназы. С этой целью использован классический ингибитор пируватдегидрогеназы – окситиамин. Известно, что образующийся в организме антикофермент окситиаминдифосфат блокирует декарбоксилирование пирувата в течение 3-24 часов, исключая тем самым синтез ацетальдегида из пирувата.

Материалы и методы

В эксперименте использовано 50 белых беспородных самцов крыс массой 180-200 г, находившихся на стандартном рационе вивария при свободном доступе к воде. Животные были разделены на четыре группы. Особям первой группы (контроль) вводили однократно подкожно 0,9%-й раствор хлорида натрия, опытным животным второй, третьей и четвертой групп вводили подкожно однократно окситиамин в дозе 200 мг/кг массы на 3, 24 и 72 часа, соответственно.

Определяли активность пируватдегидрогеназы, фосфоэтанолaminлиазы и треонинальдoлазы в печени, содержание пирувата и лактата в крови, содержание эндогенного этанола в крови, печени и почках.

Гомогенаты печени готовили на буфере, содержащем 0,1 М трис-НСl (рН 7,8) и 10⁻³М дитиотрентола, в стеклянном гомогенизаторе с тefлоновым пестиком. Гиалоплазматическую фракцию получали центрифугированием гомогената при 105 тыс. g в течение 60 мин на центрифуге VAC-601. Митохондрии печени выделяли по методу [7]. Активность пируватдегидрогеназы определяли феррицианидным методом [13]. Декарбоксилирующую активность пируватдегидрогеназы определяли по методу [9]. В гиалоплазматической фракции хроматографически по прибыли ацетальдегида измеряли активность фосфоэтанолaminлиазы [5] и треонинальдoлазы [2]. Для определения пирувата и лактата в крови использовали методы [8, 12], соответственно. Содержание эндогенного этанола определяли в безбелковых супернатантах крови, а также тканей печени и почек газохроматографически по методу [10]. Концентрацию белка определяли по методу [14].

Результаты и обсуждение

Однократная инъекция окситиамина (200 мг/кг) привела к ингибированию пируватдегидрогеназы в печени (табл. 1). Угнетение фермента особенно заметно, когда его активность определялась по пируват/НАД⁺-оксидоредуктазной реакции (ПДГ-I). Спустя 3 ч после введения антивитамина активность фермента снизилась в 3 раза и фактически не определялась в последующем.

Таблица 1 – Активность пируватдегидрогеназы, треоинальдолазы, фосфоэтаноламинлиазы (нмоль/мг белка/мин) в печени крыс после введения окситиамина 200 мг/кг

Показатель	Экспериментальные группы			
	1-я группа контроль	2-я группа 3 часа	3-я группа 24 часа	4-я группа 72 часа
Пируватдегидрогеназа-1	15 ± 1,3	5,0 ± 0,4*	-	-
Пируватдегидрогеназа -2	5,0 ± 0,5	3,7 ± 0,6	4,1 ± 1,0	7,0 ± 1,2
Фосфоэтанол-аминлиаза	19,2 ± 1,9	21,9 ± 4,4	67,2±12,5*	21,9±2,6
Треоиналь-долаза	0,27±0,02	0,36±0,02*	0,32±0,02	0,24±0,01

* Здесь и табл. 2-3 статистически значимые различия с контролем (р < 0,05); пируватдегидрогеназа-1 – данные по пируват/НАД⁺-оксидоредуктазной реакции; пируватдегидрогеназа-2 – данные по образованию ¹⁴CO₂.

Несмотря на то, что декарбоксилирующая активность пируватдегидрогеназы угнеталась в меньшей степени, накопление пирувата в крови и снижение соотношения лактат : пируват являются специфическим отражением прогрессирующего снижения активности этого ферментного комплекса в условиях опыта (табл. 2).

Таблица 2 – Содержание лактата и пирувата в крови крыс после введения окситиамина 200 мг/кг (мкМоль/г)

Экспериментальные группы	Пируват	Лактат	Лактат/пируват
1-я группа Контроль	0,065 ± 0,004	1,2 ± 0,07	20 ± 1,4
2-я группа Окситиамин (3 ч)	0,060 ± 0,004	0,8 ± 0,08*	20 ± 1,4
3-я группа Окситиамин (24 ч)	0,110 ± 0,02*	1,7 ± 0,1*	15 ± 1*
4-я группа Окситиамин (72 ч)	0,08 ± 0,01	1,4±0,08	22 ± 2,9

Следует отметить, однако, что уровень эндогенного этанола в крови и тканях крыс оставался при этом стабильным (табл. 3), что очевидно, указывает на существование альтернативных путей синтеза эндогенного этанола, каковыми могут быть реакции, катализируемые фосфоэтаноламинлиазой и треоинальдолазой.

Таблица 3 – Содержание эндогенного этанола (мкМоль) в тканях крыс после введения окситиамина 200 мг/кг

Экспериментальные группы	Кровь	Печень	Почки
1-я группа Контроль	1,5 ± 0,2	4,0 ± 0,7	5,5 ± 0,7
2-я группа Окситиамин 3 ч	1,3 ± 0,1	3,6 ± 0,5	6,0 ± 0,4
3-я группа Окситиамин 24 ч	1,5 ± 0,2	2,5 ± 0,2	7,9 ± 1,2
4-я группа Окситиамин 72 ч	1,6 ± 0,3	4,3 ± 1,3	6,2 ± 0,9

Как явствует из полученных данных (табл. 1), по мере угнетения пируватдегидрогеназы возрастает активность треоинальдолазы, достигая достоверных различий че-

рез три часа после введения окситиамина. Активность фосфоэтаноламинлиазы при этом остается без изменений. Однако спустя 24 ч, когда активность пируватдегидрогеназы полностью подавляется, а треоинальдолаза реактивируется до уровня контрольных значений, в 3,5 раза возрастает активность фосфоэтаноламинлиазы.

Опираясь на полученные данные, можно полагать, что выявленный инверсивный характер изменений активности фосфоэтаноламинлиазы и треоинальдолазы способствует предотвращению уменьшения концентрации ацетальдегида в условиях избирательного угнетения активности пируватдегидрогеназы окситиамином. Тот факт, что к 72 часу опыта наряду с восстановлением декарбоксилазной активности пируватдегидрогеназы нормализуется активность фосфоэтаноламинлиазы и треоинальдолазы (табл. 1), лишь подтверждает указанное предположение. Весьма вероятно, что выявленные изменения могут быть отчасти концептуальной имитацией метаболических перестроек, обусловленных дефицитом тиамина, развивающимся при хроническом алкоголизме.

Литература

1. Андрианова, Л.Е. Обезвреживание токсических веществ в организме / Л.Е. Андрианова, С.Н. Силуянова; под ред. Е.С. Северина // Биохимия – 5-е издание. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2009. – С. 619-623.
2. Горенштейн, Б.И. Особенности обмена треоина в печени: треоинальдолаза и её свойства / Б.И. Горенштейн, Д.Ю. Герашенко, Ю.М. Островский // ДАН БССР. 1991. – т. 35. - № 12. – С. 1127-1129.
3. Аномальная психология / Р. Карсон [и др.] – СПб.: Питер, 2004. – 1166с.
4. Метаболические предпосылки и последствия потребления алкоголя / Ю.М. Островский [и др.] – Минск: Наука и техника, 1988. – 233с.
5. Пыжик, Т.Н. Газохроматографический метод определения О-фосфорилэтаноламин лиазы в печени крыс / Т.Н. Пыжик, Д.Ю. Герашенко, Ю.М. Островский // Весці АН БССР. 1991 - № 6. – С. 45-47.
6. Пыжик, Т.Н. Влияние этаноламина на активность ферментов синтеза ацетальдегида в печени крыс / Т.Н. Пыжик, Б.И. Горенштейн. – Материалы международной практической конф. – Гродно, 2002. – С. 124-127.
7. O'Brein, F.W. Ribosomes from rat liver mitochondria. 1. Isolation procedure and contamination studies / F.W. O'Brein, G.F. Kalf // Journal of Biological Chemistry. – 1967. – V. 242. – P. 2172-2179.
8. Pyruvat / T. Bucher [et.al.] // Methoden der enzymatischen Analyse. – 1962. – Berg meyer, H.- U. ed. – P. 253-259. Verlag – Chemie, Weinheim / Bergstr.
9. Cremer, J.E. The activity of pyruvate dehydrogenase in rat brain during postnatal development / J.E. Cremer, H.M. Teal // FEBS Letters. – 1974. – Vol. 39. – P. 17-20.
10. Eriksson, C.J.P. Problems and pitfalls in acetaldehyde determination / C.J.P. Eriksson, // Alcoholism: Clinical and Experimental Research. – 1980. – Vol. 4. – P. 22-29.
11. Influence of pyruvate, threonine and phosphoethanolamine on activities of some acetaldehyde – producing enzymes / D. Gerashenko [et.al.] // Alcohol and Alcologism. – 1993. Vol. 28, № 4. – P. 437-447.
12. Hohorst, H.- L. L-(+) – Lactat. In Methoden der enzymatischen Analyse / H.- L. Hohorst. – Bergmeyer, H. – U. ed., 1962. – P. 266-277 Verlag – Chemie, Weinheim/Bergstr.
13. Jubler, C. I. Studies on the physiological functions of thiamine. 1. The effect of thiamine deficiency and thiamine antagonists on the oxidation of ?-keto acids by rat tissues / C. I. Jubler // Journal of Biological Chemistry. – 1961. – Vol. 236. – P. 3112-3120.
14. Lowry, O.H. Protein measurement in the Folin phenol reagent / O.H. Lowry [et. al.] // Journal of Biological Chemistry. – 1951. – Vol. 193. – P. 265-275.

Поступила 18.05.10