

Влияние тиамина и его метаболитов на активность тканевой и очищенной алкогольдегидрогеназы

Данные о взаимодействии некоторых витаминов группы В, в том числе тиамина, и алкоголя в организме широко представлены в литературе [5, 6, 9—12, 17]. Однако вопрос о влиянии тиамина на обмен спиртов и активность алкогольдегидрогеназы (АДГ) изучен мало. В результате исследования влияния тиамина на микросомальное НАДФ-зависимое окисление этанола установлено, что дефицит тиамина в пище снижает окисление этого спирта, а добавление к микросомам тиаминпирофосфата (ТПФ) восстанавливает процесс [13]. Это, в сочетании с анализом молекулярной структуры АДГ [1, 7], механизмов связывания НАД с ферментом [16] и ингибирования его некоторыми органическими эфирами и циклическими соединениями [15], свидетельствует о физиологической роли тиамина в регуляции активности АДГ. Особый интерес поэтому представляет недавно открытый процесс использования тиамина и 4-метил-5-β-оксиэтилтиазола (ТЗ) как субстратов для АДГ [8]. В связи с этим мы поставили задачу исследовать влияние тиамина и его метаболитов на активность тканевой эндогенной АДГ и ее очищенного препарата.

Методика

Все исследования по изучению активности эндогенной АДГ проведены на крысах-самках массой 130—160 г. Активность экзогенной АДГ изучали с помощью препарата АДГ (активность 6,0 АЕ/мг), полученного из дрожжей (фирма «Reanal», США). В опытах *in vivo* крысам различных групп подкожно вводили тиамин, тиаминмонофосфат (ТМФ), тиаминпирофосфат (ТПФ), 4-метил-5-β-оксиэтилтиазол (ТЗ) и тioxром (ТХ) в дозе 0,16 мкмоль·л⁻¹·г⁻¹ ткани для каждого из указанных соединений. Животным контрольной группы вводили физиологический раствор. Затем опытных и контрольных крыс через 15 мин, 2 ч и 24 ч забивали и определяли активность АДГ в крови, тонком кишечнике, печени и мозгу. В опытах *in vitro* в инкубационную среду (конечный объем 3,0 мл), содержащую глициновый буфер (рН 8,9), раствор НАД (1 мкмоль/л) и этанол (конечная концентрация 3,2 %), добавляли тиамин или его метаболиты (конечная концентрация 0,08; 0,16 и 0,32 мкмоль/л) и оставляли на 20 мин при температуре 37 °С. Затем в пробы вносили препарат фермента и спектрофотометрически регистрировали прирост НАДН [4]. В специально проведенных предварительных исследованиях мы не обнаружили прироста НАДН при исключении из инкубационной среды этанола, что могло бы быть при окислении АДГ, имеющихся в среде тиамина или ТЗ, возможно, вследствие слишком малой их концентрации. Содержание белка в пробах определяли по методу Лоури [14]. Результаты обрабатывали статистически [2].

Результаты и их обсуждение

Прежде всего мы изучили влияние парентерального введения тиамина и его метаболитов на активность АДГ в тканях крыс. В табл. 1 представлены результаты, свидетельствующие о влиянии тиамина и его метаболитов на активность АДГ в крови, тонкой кишке, печени, мозгу крыс. Показано, что лишь тиамин через 2 и 24 ч после введения существенно повышал активность АДГ в крови. Метаболиты тиамина не изме-

© С. А. ПЕТРОВ, И. А. ЖЕЛЯЗКОВА, 1991.

Таблица 1. Динамика активности эндогенной алкогольдегидрогеназы в разных органах крыс в зависимости от введения им тиамина и его метаболитов ($M \pm m$), $\text{ммоль} \cdot \text{л}^{-1} \text{НАДН} \cdot \text{г}^{-1} \text{ткани}$

Условие эксперимента	Время, прошедшее после инъекции витамина		
	15 мин	2 ч	24 ч
Кровь			
Введение физиологического раствора (контроль)	$0,76 \pm 0,015$	$0,77 \pm 0,015$	$0,077 \pm 0,014$
Введение тиамина	$0,122 \pm 0,021$ $P < 0,05$	$0,135 \pm 0,022$ $P < 0,05$	$0,121 \pm 0,010$ $P < 0,05$
Введение метаболитов тиамина:			
тиаминмонофосфата	$0,125 \pm 0,024$ $P > 0,05$	$0,120 \pm 0,030$ $P > 0,05$	$0,080 \pm 0,016$ $P > 0,05$
тиаминпирофосфата	$0,114 \pm 0,033$ $P > 0,05$	$0,131 \pm 0,039$ $P > 0,05$	$0,099 \pm 0,027$ $P > 0,05$
тиохрома	$0,116 \pm 0,021$ $P > 0,05$	$0,143 \pm 0,030$ $P > 0,05$	$0,80 \pm 0,020$ $P > 0,05$
4-метил-5 β -оксиэтилтиазола	$0,140 \pm 0,046$ $P > 0,05$	$0,148 \pm 0,054$ $P > 0,05$	$0,107 \pm 0,044$ $P > 0,05$
Тонкая кишка			
Введение физиологического раствора (контроль)	$0,0026 \pm 0,0003$	$0,0026 \pm 0,0003$	$0,0025 \pm 0,0003$
Введение тиамина	$0,0070 \pm 0,0013$ $P < 0,01$	$0,0028 \pm 0,0005$ $P > 0,05$	$0,0025 \pm 0,0016$ $P > 0,05$
Введение метаболитов тиамина:			
тиаминмонофосфата	$0,0019 \pm 0,0006$ $P > 0,05$	$0,0024 \pm 0,0004$ $P > 0,05$	$0,0031 \pm 0,0008$ $P > 0,05$
тиаминпирофосфата	$0,0027 \pm 0,0003$ $P > 0,05$	$0,0023 \pm 0,0006$ $P > 0,05$	$0,0020 \pm 0,0006$ $P > 0,05$
тиохрома	$0,0016 \pm 0,0001$ $P < 0,02$	$0,0021 \pm 0,0004$ $P > 0,05$	$0,0029 \pm 0,0007$ $P > 0,05$
4-метил-5 β -оксиэтилтиазола	$0,0032 \pm 0,0010$ $P > 0,05$	$0,0031 \pm 0,0005$ $P > 0,05$	$0,0021 \pm 0,0003$ $P > 0,05$
Печень			
Введение физиологического раствора (контроль)	$0,0128 \pm 0,0038$	$0,0127 \pm 0,0040$	$0,0126 \pm 0,0041$
Введение тиамина	$0,0107 \pm 0,0040$ $P > 0,05$	$0,0168 \pm 0,0030$ $P > 0,05$	$0,0155 \pm 0,0060$ $P > 0,05$
Введение метаболитов тиамина:			
тиаминмонофосфата	$0,0273 \pm 0,0060$ $P > 0,05$	$0,0149 \pm 0,0050$ $P > 0,05$	$0,0177 \pm 0,0090$ $P > 0,05$
тиаминпирофосфата	$0,0117 \pm 0,0040$ $P > 0,05$	$0,0108 \pm 0,0030$ $P > 0,05$	$0,0158 \pm 0,0090$ $P > 0,05$
тиохрома	$0,0167 \pm 0,0070$ $P > 0,05$	$0,0211 \pm 0,0050$ $P > 0,05$	$0,0145 \pm 0,0060$ $P > 0,05$
4-метил-5 β -оксиэтилтиазола	$0,0125 \pm 0,0052$ $P > 0,05$	$0,0183 \pm 0,0040$ $P > 0,05$	$0,0190 \pm 0,0010$ $P > 0,05$
Мозг			
Введение физиологического раствора (контроль)	$0,0117 \pm 0,0010$	$0,0117 \pm 0,0010$	$0,0116 \pm 0,0011$
Введение тиамина	$0,0122 \pm 0,0016$ $P > 0,05$	$0,0100 \pm 0,0017$ $P > 0,05$	$0,0119 \pm 0,0010$ $P > 0,05$
Введение метаболитов тиамина:			
тиаминмонофосфата	$0,0111 \pm 0,0013$ $P > 0,05$	$0,0090 \pm 0,0014$ $P > 0,05$	$0,0121 \pm 0,0014$ $P > 0,05$
тиаминпирофосфата	$0,0109 \pm 0,0013$ $P > 0,05$	$0,0096 \pm 0,0015$ $P > 0,05$	$0,0120 \pm 0,0020$ $P > 0,05$
тиохрома	$0,0107 \pm 0,0010$ $P > 0,05$	$0,0139 \pm 0,0018$ $P > 0,05$	$0,0132 \pm 0,0026$ $P > 0,05$
4-метил-5 β -оксиэтилтиазола	$0,0115 \pm 0,0016$ $P > 0,05$	$0,0174 \pm 0,0020$ $P < 0,05$	$0,0151 \pm 0,0010$ $P < 0,05$

няли активн
15 мин посл
табл. 1). В
рез 15 мин Т
достоверных
ружено. В пе
изменяло ак
2 и 24 ч пос

Таким о
в крови и т
крови этот э
через 15 мин
гибирование
действием Т
исследовани
рактера мет
ростью пост
органы.

Для выя
метаболитов
таболитов в
очищенной А
30—35% пов
активность д
раций тиамин
не изменяло
на активност
условиях нап
тиамином ил
зывалось, в
окисления ти

Таблица 2. А
тиамина и его м

Услови

Введение физиол
(контроль)

Введение тиамин

Введение метаб
тиаминмонос

тиаминпирофосф

тиохрома

4-метил- β -оксиэ

Было про
мина и его м
среде (табл.
ни при одной
ность АДГ. Ти
Важно указат
мента тиамин
роли данных

няли активность фермента в крови. В тонкой кишке тиамин через 15 мин после введения существенно повышал активность АДГ (см. табл. 1). В более поздние сроки исследования этот эффект исчезал. Через 15 мин ТХ вызывал снижение активности АДГ. В остальных случаях достоверных изменений активности фермента в тонкой кишке не обнаружено. В печени (см. табл. 1) ни одно из исследованных соединений не изменяло активность фермента. В мозгу (см. табл. 1) только ТЗ через 2 и 24 ч после введения существенно повышал активность АДГ.

Таким образом, в результате исследований *in vivo* оказалось, что в крови и тонкой кишке тиамин повышает активность АДГ, причем в крови этот эффект наблюдается через 2 и 24 ч, а в тонкой кишке — через 15 мин. В мозгу активирующим действием обладал только ТЗ. Ингибирование АДГ наблюдалось только в тонкой кишке и только под действием ТХ. Видимая разноречивость результатов, полученных при исследовании указанных органов, вероятно, связана с различиями характера метаболизма тиамина в разных тканях и неодинаковой скоростью поступления отдельных метаболитов тиамина в различные органы.

Для выяснения характера непосредственного действия тиамина и его метаболитов на АДГ мы изучили влияние всех вышеперечисленных метаболитов в концентрациях 0,08; 0,16 и 0,32 мкмоль/л на активность очищенной АДГ из дрожжей (табл. 2). Показано, что тиамин и ТЗ на 30—35% повышали активность АДГ, а ТХ в среднем на 30% снижал активность данного фермента. Важно отметить, что изменение концентраций тиамина и его метаболитов от 0,08 до 0,32 мкмоль/л существенно не изменяло ни значение, ни характер действия указанных соединений на активность АДГ. Такая закономерность свидетельствует о том, что в условиях наших экспериментов не было конкуренции между этанолом и тиаминном или его метаболитами за фермент. Кроме того, как уже указывалось, в специальных прямых экспериментах мы не наблюдали окисления тиамина или его метаболитов АДГ.

Таблица 2. Активность экзогенной АДГ в зависимости от концентрации введенных тиамина и его метаболитов ($M \pm m$), мкмоль $\cdot$ л⁻¹ НАДН $\cdot$ мг⁻¹

Условие эксперимента	Концентрация тиамина и его метаболитов в инкубационной среде		
	0,08 мкмоль/л	0,16 мкмоль/л	0,32 мкмоль/л
Введение физиологического раствора (контроль)	0,768 $\pm$ 0,67	0,789 $\pm$ 0,077	0,780 $\pm$ 0,079
Введение тиамина	1,063 $\pm$ 0,059 P < 0,05	1,067 $\pm$ 0,063 P < 0,05	1,064 $\pm$ 0,065 P < 0,05
Введение метаболитов тиамина:			
тиаминмонофосфата	0,892 $\pm$ 0,093 P > 0,05	0,951 $\pm$ 0,059 P > 0,05	0,931 $\pm$ 0,092 P > 0,05
тиаминпирофосфата	0,876 $\pm$ 0,063 P > 0,05	0,894 $\pm$ 0,051 P > 0,05	0,881 $\pm$ 0,087 P > 0,05
тиохрома	0,589 $\pm$ 0,041 P < 0,05	0,555 $\pm$ 0,068 P < 0,05	0,561 $\pm$ 0,052 P < 0,05
4-метил- β -оксиэтилтиазола	1,127 $\pm$ 0,082 P < 0,05	1,022 $\pm$ 0,064 P < 0,05	1,047 $\pm$ 0,061 P < 0,05

Было проведено также исследование характера взаимодействия тиамина и его метаболитов с АДГ при различных концентрациях НАД в среде (табл. 3). Прежде всего необходимо отметить, что ТМФ и ТПФ ни при одной из исследуемых концентраций НАД не влияли на активность АДГ. Тиамин и ТЗ во всех случаях повышали активность АДГ. Важно указать, что с повышением концентрации НАД стимуляция фермента тиаминном и ТЗ ослаблялась. Это свидетельствует о возможной роли данных соединений в регуляции взаимодействия АДГ и НАД.

Таблица 3. Активность экзогенной АДГ в зависимости от концентрации НАД в среде при наличии тиамина и его метаболитов ($M \pm m$), $\mu\text{моль} \cdot \text{л}^{-1}$ НАДН $\cdot \text{мг}^{-1}$ белка

Условие эксперимента	Концентрация НАД в среде		
	0,5 $\mu\text{моль/л}$	1,0 $\mu\text{моль/л}$	2,0 $\mu\text{моль/л}$
Введение физиологического раствора (контроль)	$0,271 \pm 0,035$	$0,789 \pm 0,077$	$0,762 \pm 0,027$
Введение тиамина:	$0,420 \pm 0,015$ $P < 0,01$	$1,067 \pm 0,063$ $P < 0,05$	$0,871 \pm 0,019$ $P < 0,02$
Введение метаболитов тиамина:			
тиаминамонофосфата	$0,380 \pm 0,025$ $P > 0,05$	$0,951 \pm 0,059$ $P < 0,05$	$0,856 \pm 0,047$ $P > 0,05$
тиаминапирофосфата	$0,220 \pm 0,013$ $P > 0,05$	$0,894 \pm 0,051$ $P > 0,05$	$0,835 \pm 0,036$ $P > 0,05$
тиохрома	$0,207 \pm 0,013$ $P < 0,05$	$0,555 \pm 0,068$ $P < 0,05$	$0,778 \pm 0,030$ $P > 0,05$
4-метил-5 β -оксизетилтиазола	$0,386 \pm 0,031$ $P < 0,05$	$1,022 \pm 0,064$ $P < 0,05$	$0,924 \pm 0,077$ $P > 0,05$

Тиохром при концентрациях НАД 0,5 и 1,0 $\mu\text{моль/л}$ снижал активность АДГ на 24—30%. При концентрации НАД 2,0 $\mu\text{моль/л}$ ингибирования фермента ТХ не наблюдалось. Данный эффект может быть связан с существованием конкуренции между НАД и ТХ за связывание с АДГ.

Совокупность полученных *in vivo* и *in vitro* результатов может быть интерпретирована следующим образом. По-видимому, тиамин и, частично, ТЗ способны повышать активность АДГ за счет их участия в реализации взаимодействия НАД и фермента. Отсутствие данного эффекта в печени может быть связано с высокими концентрациями НАД в ней, которые существенно превышают таковые в других органах. Тиохром, который, как известно [3], в значительном количестве образуется из тиамина в просвете кишки, ингибирует АДГ.

S. A. Petrov, I. A. Zhelyazkova

THE INFLUENCE OF THIAMINE AND ITS METABOLITES ON THE ACTIVITY OF TISSUE AND PURIFIED ALCOHOLDEHYDROGENASE

Thiamine is shown to have a stimulatory action on alcoholdehydrogenase activity in blood and small intestines of white rats. The same effect is obtained on the purified alcoholdehydrogenase as well. Thiochrome inhibits the enzyme preparation.

I. I. Mechnikov University,
Ministry of Higher and Secondary
Special Education of the Ukrainian SSR, Odessa

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Диксон М., Уэбб Э. Ферменты.— Москва: Мир, 1982.—408 с.
2. Математический энциклопедический словарь // Под. ред. Ю. В. Прохорова и др.— М.: Сов. энциклопедия, 1988.—847 с.
3. Островский Ю. М. Кокарбоксилаза и другие тиаминфосфаты.— Минск: Наука и техника, 1974.—263 с.
4. Островский Ю. М. Экспериментальная витаминология.— Минск: Наука и техника, 1979.—223 с.
5. Островский Ю. М., Сатановская В. И., Островский С. Ю. Метаболические предпосылки и последствия потребления алкоголя.— Минск: Наука и техника, 1988.—263 с.
6. Сидики П., Розанов А. Я. Влияние этанолового наркоза на обмен ^{35}S тиамина в тканях мышей // Физиол. журн.— 1988.—34, № 4.— С. 36—41.
7. Страйер Л. Биохимия.— Москва: Мир, 1985.—308 с.
8. Dalvi R. R. Purification of rat liver alcohol dehydrogenase and studies on kinetic characteristics of thiamine, thiazole and NAD by the purified enzyme // Indian J. Biochem. and Biophys.— 1987.—24, N 4.— P. 248—251.

9. Dastur D. K. alcoholism. A P. 143—153.
10. Hell D., Six 1977.— N 21.
11. Hell D., Six Deutsch. Med P. 11—14.
12. Hoympa A. P. 11—14.
13. Jakabe Mach ethanol oxid P. 260—265.
14. Louri O., R reagent // S. I
15. Normann P. alcohol dehy
16. Sekhar V., C dehydrogenas N 14.— P. 50
17. Wood B., Br Med.— 1977.—

Одес. ун-т им. И. М.-ва высш. и с

УДК 616.89—008.441

Г. Х. Божко, Т. I.

Катехолами при действии

Современное этанолом хар вия продуктов важную роль [7]. АЦА мох ции, привыка ханизмы самс щими свойств ции этанолом (КА) [5].

Цель нап норадреналин при изолиров коголизации.

Методика

В опытах исп Одна из груп нол (3 г/кг) в ментов выпол нола) и в хро коголизации 10 сут крысы течение 10 су 3 г/кг в виде 2 коголизации 1 отмены этано

с г. х. БОЖКО,

Физиол. журн.,

9. Dastur D. K., Santhadevi N., Quadros E. N. The B-vitamins in malnutrition with-alcoholism. A model of intervitamin relationships // Brit. J. Nutr.—1976.—36, N 2.— P. 143—153.
10. Hell D., Six P. Vitamin B₁, B₂ and B₆ status in chronic alcoholics // Nutr. Metab.—1977.— N 21 / suppl. 13.— P. 134—135.
11. Hell D., Six P. Thiamine, riboflavin and pyridoxine supply in chronic alcoholism // Deutsch. Med. Wochenschr.—1977.— N. 102.— P. 962—966.
12. Hoymra A. M. Alcohol and thiamine metabolism // Alcoholism.—1983.—7, N 1.— P. 11—14.
13. Jakabe Machi, Isokaua Ioshinori. Participation of thiamine in hepatic microsomal ethanol oxidizing system // Int. J. Vitam. and Nutr. Res.—1982.—52, N 3.— P. 260—265.
14. Louri O., Rosenbrogh N., Fara A. Protein measurement with the Folin phenol reagent // S. Biol. Chem.—1951.— N. 193.— P. 265—270.
15. Normann P. T., Ripel A., Morland I. Kinetic parameters of toluene inhibition of alcohol dehydrogenase // Pharmacol. and Toxicol.—1987.—61, N 1.— P. 49.
16. Sekhar V., Chandia, Plapp Bryce V. Mechanism of binding of horse liver alcohol dehydrogenase and nicotinamide adenine dinucleotide // Biochemistry.—1988.—27, N 14.— P. 5082—5088.
17. Wood B., Breen K. T., Penengton D. Tiamine status in alcoholism // Austr. N. S. T. Med.—1977.— N 7.— P. 445—454.

Одес. ун-т им. И. И. Мечникова
М-ва высш. и сред. спец. образования УССР

Материал поступил
в редакцию 20.03.90

УДК 616.89—008.441.3—092.9—008.9

Г. Х. Божко, Т. П. Бойко, П. В. Волошин

Катехоламины тканей и крови крыс при действии ацетальдегида и этанола

Современное изучение функций организма в условиях интоксикации этанолом характеризуется возросшим интересом к исследованию действия продуктов его окисления. Получены новые данные, подтверждающие важную роль ацетальдегида (АЦА) в патогенезе алкогольной болезни [7]. АЦА может принимать участие в механизмах алкогольной мотивации, привыкания, зависимости. Поведенческие эффекты этанола и механизмы самовведения АЦА в большой мере обусловлены подкрепляющими свойствами АЦА [6]. Значительное место в изучении интоксикации этанолом занимает выяснение нарушений обмена катехоламинов (КА) [5].

Цель нашей работы заключалась в исследовании концентрации норадреналина (НА) и адреналина (АД) в тканях и крови животных при изолированном влиянии АЦА и на фоне острой и хронической алкоголизации.

Методика

В опытах использовали 86 беспородных крыс-самцов массой 250—300 г. Одна из групп животных за 1 ч до начала исследования получала этанол (3 г/кг) в виде 25%-ного раствора внутривентриально. Часть экспериментов выполнена на модели острой алкоголизации (0,5 ч действия этанола) и в хроническом эксперименте, когда животные подвергались алкоголизации возрастающими дозами этанола в течение 1 мес. Первые 10 сут крысы получали по 4 г/кг этанола в составе рациона; далее, в течение 10 сут — 6 г/кг. В последующие 10 сут этанол вводили по 3 г/кг в виде 25%-ного раствора внутривентриально. После длительной алкоголизации КА исследовали, как правило, на следующие сутки после отмены этанола, у части крыс — через 48 ч. В отдельной постановке

© Г. Х. БОЖКО, Т. П. БОЙКО, П. В. ВОЛОШИН, 1991.