

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Гриньків М.Я. Роль кальція в механізмі екструзії пищеварительных ферментов клетками поджелудочной железы: Автореф. дис. ... канд.биол.наук. — Львов, 1989. — 16 с.
2. Дубицький Л.О., Шостаковська І.В. Дослідження ролі зовнішньо- і внутрішньоклітинного кальцію в екструзії пепсиногена ізольованими залозами шлунка // Физиол. журн. — 1992. — 38, № 1. — С. 46—51.
3. Костиук П.Г. Кальций и клеточная возбудимость. — М.: Наука, 1986. — 256 с.
4. Шуба М.Ф. Пути и механизмы трансмембранного входа в гладкомышечные клетки ионов кальция, участвующих в активации сокращения // Физиол. журн. — 1981. — 27, № 4. — С. 533—541.
5. Шубникова Е.А., Коротько Г.Ф. Секреция желез. — М.: Изд-во Моск. ун-та, 1986. — 131 с.
6. Покровский А.А., Алтекер С.Г. Методы изучения активности ферментов // Биохимические методы исследования / Под. ред. А.А.Покровского. — М.: Медицина, 1969. — С. 107—218.
7. Bolton T.B., Mackenzie I., Anrson P.I., Lim S.P. Calcium channels in smooth muscle cells // Biochem. Soc. Trans. — 1988. — 16, № 4. — P. 492—493.
8. D'Emden M.C., Wark Y.D. Vitamin D — enhanced thyrotropin release from rat pituitary cells: effects of Ca^{2+} , dihydropyridines and ionomycin // J. Endocrinol. — 1989. — 121, № 3. — P. 441—450.
9. Dormer R., Rown G., Donghney C. Intracellular Ca in pancreatic acinar cells: regulation and role in stimulation of enzyme secretion // Biosci. Repts. — 1987. — 7, № 4. — P. 334—344.
10. Guo Yau-Shi, Thompson J.C., Singh P. Role of Ca^{2+} in bombesin-stimulated release of gastrin and somatostatin from isolated perfused rat stomach // Amer. J. Physiol. — 1988. — 255, № 5, Pt 1. — P. G627—G632.
11. Kealey H.H., Rajon A.S., Boud A.E., Kunze D.J. Characterization of voltage-dependent Ca^{2+} channels channel sin β -cells line // Diabetes. — 1989. — 38, № 2. — P. 188—193.
12. Kleppisch T., Gollasch M., Lewinsohn D. et al. Spannungs — bhangige Ca-kanale: G — Protein — vermittelte Modulation durch Hormone, Transmitter und Mediatoren // Wiss. Z. Humboldt Univ. Berlin Med. R. — 1992. — 41, № 3. — P. 15—22.
13. Nandi Y., King R.L., Kaplan D.S., Levine R.A. Mechanisms of gastric proton pump inhibition by calcium channel antagonists // J. Pharmacol and Exp. Therap. — 1990. — 252, № 3. — P. 1102—1107.
14. Plant T.D. Properties and calcium-dependent inactivation of calcium currents in cultured mouse pancreatic B-cells // J. Physiol. — 1988. — 404. — P. 731—747.
15. Williams J., Burnham D. Calcium and stimulus — secretion coupling in pancreatic acinar cells // Calcium Biol. Sust. Proc. 67. th Annu. Mech. Fed. Amer. Soc. Environ. Biol. — (Chicago, III, 10—15 Apr., 1983). — New York, London, 1985. — P. 83—91.

Львів. ун-т ім. І.Франка
М-ва освіти України

Матеріал надійшов
до редакції 02.12.93

УДК 577.152.042:577.152.18: 616-099: 547.262

В.В.Соколовська, С.А.Петров

Активация глутатионредуктазы за умов гострої алкогольної інтоксикації

В опытах, проведенных на крысах, изучали влияние острой алкогольной интоксикации на активность цитоплазматической и митохондриальной форм глутатионредуктазы. Установлена активация этого фермента при действии алкоголя. В опытах *in vitro* данный эффект был подтвержден. При изучении флавинового статуса тканей в условиях действия острой алкогольной интоксикации наблюдали уменьшение общего содержания флавинов и, в частности, флавинадениннуклеотида (ФАД) в тканях

© В.В.СОКОЛОВСЬКА, С.А.ПЕТРОВ, 1995

животных при воздействии этанола. Показано, что содержание флавинов не является фактором, определяющим активность глутатионредуктазы. Для выяснения механизма этого явления изучали влияние острой алкогольной интоксикации на содержание НАДФ·Н и НАД·Н в тканях и крови животных, а также активность алкогольдегидрогеназы, как основного продукта восстановительных пиридиннуклеотидов в тканях алкоголизированных крыс. Установлено, что увеличение активности алкогольдегидрогеназы в тканях опытных животных резко увеличивает количество восстановленных никотинамидных коферментов и в результате этого активность глутатионредуктазы увеличивается.

Вступ

Участь різних тіолових біологічно активних речовин (одним із найважливіших серед яких є глутатіон) в обміні етанолу вивчено детально [1, 7—9]. Вплив етанолу на обмін сполук, які мають у своєму складі сірку, сьогодні також доведено [3]. На метаболізм глутатіону певну дію чинить алкоголь. Зокрема, показано зменшення вмісту як самого глутатіону, так і активності -глутамілцистеїнсинтетази і глутатіон-S-трансферази під впливом алкоголю [8]. Отже метою нашої роботи було вивчення особливостей регуляції активності глутатіонредуктази — найважливішого ферменту обміну глутатіона — за умов гострої алкогольної інтоксикації.

Методика

Досліди провадили на щурах лінії Вістар масою 120-140 г. Тварин було поділено на дві групи — контрольну та дослідну. Дослідним тваринам парентерально вводили етанол у дозі 6 г/кг. Через 120 хв тварин обох груп декапітували. На холоді видаляли тканини та збирали кров для отримання плазми. Активність глутатіонредуктази (НАДФ·Н₂-глутатіонредуктаза, КФ 1.6.4.2) визначали спектрофотометрично при довжині хвилі 340 нм за зменшення вмісту НАДФ·Н [2]. Активність цитоплазматичного ферменту визначали у надосадовій рідині, одержаній після відділення мітохондрій, а мітохондріального — після руйнування мітохондрій розчином тритону Х-100. Активність ферменту розраховували за формулою

$$A = 3 \cdot \Delta E \cdot 1000 / 6,22a,$$

де а — вміст білку в дослідній пробі, визначений біуретовим методом. Поряд з дослідями *in vivo* вивчали вплив етанолу на активність глутатіонредуктази *in vitro*. Етанол вносили в інкубаційне середовище безпосередньо перед визначенням до його кінцевої концентрації 0,1 %. Активність алкогольдегидрогенази (НАД-оксидоредуктази, КФ 1.1.1.1) визначали також спектрофотометрично при довжині хвилі 340 нм за збільшенням вмісту НАД·Н [2]. У гомогенаті, а також у всіх фракціях, одержаних після відділення й руйнування мітохондрій визначали флуориметрично загальний вміст флавінів, флавінадениндинуклеотиду (ФАД), НАДФ·Н і НАД·Н [6].

Результати дослідження оброблено статистично [4].

Результати та їх обговорення

Насамперед ми вивчали вплив гострої алкогольної інтоксикації на активність глутатіонредуктази (цитоплазматичної та мітохондріальної форм) у плазмі крові, головному мозку, печінці та тонких кишках (табл. 1). Встановлено, що введення алкоголю вірогідно збільшувало активність глу-

Таблиця 1. Активність глутатіонредуктази в крові та тканинах деяких органів білих щурів за умов гострої алкогольної інтоксикації ($M \pm m$), нмоль НАДФ·Н/хв·г

Об'єкт дослідження	До введення алкоголю (контроль)	Парентеральне введення алкоголю (6 г/кг)	Введення алкоголю в інкубаційне середо- вище до кінцевої концентрації 0,1 %
Плазма крові	6,981 $\pm$ 0,524	11,346 $\pm$ 0,815*	12,496 $\pm$ 1,372*
Головний мозок			
цитоплазматична форма	22,803 $\pm$ 1,339	49,276 $\pm$ 2,156*	59,811 $\pm$ 2,466*
мітохондріальна форма	24,049 $\pm$ 2,561	40,088 $\pm$ 2,374*	46,730 $\pm$ 3,856*
Печінка			
цитоплазматична форма	36,328 $\pm$ 2,489	50,788 $\pm$ 1,358*	75,549 $\pm$ 3,321*
мітохондріальна форма	23,577 $\pm$ 2,421	48,313 $\pm$ 3,353*	68,875 $\pm$ 6,958*
Тонкі кишки			
цитоплазматична форма	47,145 $\pm$ 3,515	68,435 $\pm$ 2,302*	61,894 $\pm$ 6,952
мітохондріальна форма	40,100 $\pm$ 4,004	71,251 $\pm$ 4,217*	76,846 $\pm$ 6,160*

Примітка. Тут і в табл. 2 і 3 * — $P < 0,05$.

татіонредуктази. Активність мітохондріальної її форми збільшувалася від 67 до 100 % у головному мозку, печінці та тонких кишках, а цитоплазматичної — на 36 % у печінці, на 45 % у тонких кишках і більше ніж удвічі в головному мозку. В плазмі крові активність ферменту також збільшувалася на 82 % у дослідних тварин. Майже аналогічну картину спостерігали у дослідях *in vitro*. В усіх вивчених тканинах введення алкоголю в інкубаційне середовище вірогідно збільшувало активність обох форм глутатіонредуктази. При цьому значне підвищення активності ферменту спостерігалось у головному мозку та печінці. Значення активності глутатіонредуктази у тонкій кишці у дослідях *in vitro* практично були близькими до аналогічних результатів, отриманих при парентеральному введенні алкоголю тваринам. Одержаний ефект активації глутатіонредуктази за умов гострої алкогольної інтоксикації та під час внесення етанолу в проби у дослідях *in vitro* вимагав пояснень можливих причин цього явища. Насамперед ми вивчили флавіновий статус у тканинах при гострій алкогольній інтоксикації, оскільки, як відомо, глутатіонредуктаза є флавінзалежним ферментом (табл. 2). Як видно з цієї таблиці в гомогенатах тканин головного мозку, печінки та тонких кишок спостерігалось вірогідне зменшення загального вмісту флавінів і, особливо, ФАД у тканинах тварин за умов дії етанолу. Аналогічну картину спостерігали і у надосадовій рідині, одержаній після відділення мітохондрій від тканин алкоголізованих щурів. Зниження загального вмісту флавінів і ФАД у мітохондріальній фракції відмічали тільки в печінці і головному мозку. В кишках статистично вірогідних змін не спостерігалось. У плазмі крові спостерігали протилежний ефект. Через 120 хв дії алкоголю збільшувався загальний вміст флавінів тільки в плазмі крові, що може бути пов'язано зі зниженням вмісту води під впливом алкоголю [10]. Зменшення загального вмісту флавінів у інших тканинах продемонстровано нами у попередніх дослідях [5], в яких було встановлено, що під впливом гострої алкогольної інтоксикації збільшується поновлення рибофлавіну в організмі, яке здійснюється внаслідок виходу ендогенних форм вітаміну з тканин.

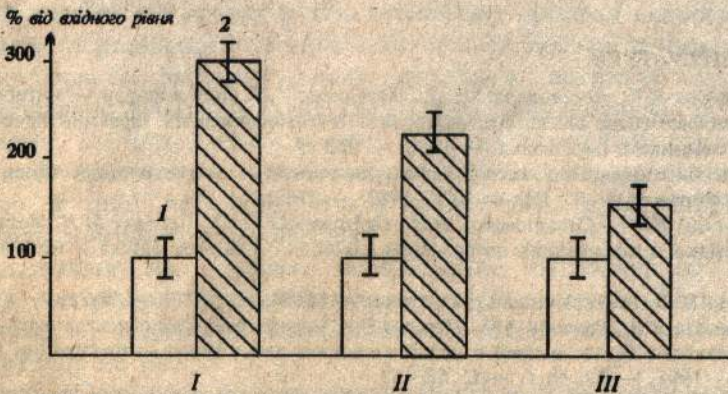
Таким чином, ці результати свідчать, що вміст флавінів не є фактором, який визначає активність глутатіонредуктази. Очевидно, і невеликої кількості

Таблиця 2. Концентрація флавінів у крові та тканинах деяких органів білих щурів за умов гострої інтоксикації ($M \pm m$), мкг/г

Об'єкт дослідження	Неалкоголізовані тварини (контроль)		Алкохолізовані тварини (дослід)	
	загальні флавіни	флавінаденін-динуклеотид	загальні флавіни	флавінаденін-динуклеотид
Кров	10,316 $\pm$ 0,326	8,078 $\pm$ 0,626	19,448 $\pm$ 2,174*	2,674 $\pm$ 0,411*
Головний мозок				
Гомогенат	12,702 $\pm$ 0,826	10,649 $\pm$ 0,637	7,737 $\pm$ 0,692*	3,398 $\pm$ 0,537*
Надосадова рідина	9,555 $\pm$ 1,023	8,146 $\pm$ 0,992	4,900 $\pm$ 0,621*	2,427 $\pm$ 0,383*
Мітохондрії	1,108 $\pm$ 0,062	0,868 $\pm$ 0,092	1,094 $\pm$ 0,044	0,609 $\pm$ 0,070*
Печінка				
Гомогенат	35,140 $\pm$ 0,618	24,653 $\pm$ 0,556	25,017 $\pm$ 2,602*	14,260 $\pm$ 1,517*
Надосадова рідина	21,116 $\pm$ 2,306	14,412 $\pm$ 0,854	14,546 $\pm$ 1,349*	7,281 $\pm$ 0,814*
Мітохондрії	7,485 $\pm$ 0,694	5,894 $\pm$ 0,586	4,343 $\pm$ 0,311*	2,830 $\pm$ 0,167*
Тонка кишка				
Гомогенат	16,248 $\pm$ 0,282	10,467 $\pm$ 0,863	11,864 $\pm$ 1,242*	6,068 $\pm$ 0,900*
Надосадова рідина	13,024 $\pm$ 1,938	9,443 $\pm$ 0,882	6,297 $\pm$ 1,093*	2,275 $\pm$ 0,420*
Мітохондрії	1,567 $\pm$ 0,305	1,119 $\pm$ 0,225	1,328 $\pm$ 0,056	0,699 $\pm$ 0,095

ендогенних флавінів, яка залишається в тканинах за умов гострої алкогольної інтоксикації, досить для забезпечення функціонування глутатіонредуктази.

Відомо, що вміст у тканинах НАДФ·Н істотно впливає на активність глутатіонредуктази. Тому надалі ми вивчили вплив гострої алкогольної інтоксикації на вміст НАДФ·Н і НАД·Н у тканинах тварин (малюнок).



Зміни вмісту НАДФ·Н і НАД·Н у печінці (I), головному мозку (II) і тонких кишках (III) білих щурів при введенні фізіологічного розчину (I) та за умов алкогольної інтоксикації (2).

Встановлено, що гостра алкогольна інтоксикація підвищувала вміст відновлених піридиннуклеотидів у всіх вивчених тканинах. У пошуках основного продуцента відновлених піридиннуклеотидів при гострій алкогольній інтоксикації ми звернулися до дослідження алкогольдегідрогенази. Як видно з табл.3, активність алкогольдегідрогенази істотно збільшувалася в плазмі крові, головному мозку, печінці та тонких кишках у алкоголізованих тварин. Внаслідок підвищення активності алкогольдегідрогенази у тканинах дослідних тварин різко збільшувалася кількість відновлених нікотинамідних коферментів. У результаті цього підвищувалась активність глутатіонредуктази, для функціонування якої необхідний НАД·Н.

Таблиця 3. Активність алкогольдегідрогенази в крові та тканинах деяких органів білих щурів за умов парентерального введення етанолу — 6 г/кг ($M \pm m$), мкмоль/л НАД⁺ Н/г·хв

Об'єкт дослідження	Неалкоголізовані тварини (контроль)	Алкоголізовані тварини (дослід)
Кров (плазма)	0,080 $\pm$ 0,008	0,121 $\pm$ 0,013*
Головний мозок	0,012 $\pm$ 0,001	0,028 $\pm$ 0,002*
Печінка	0,013 $\pm$ 0,002	0,118 $\pm$ 0,012*
Тонка кишка	0,008 $\pm$ 0,001	0,024 $\pm$ 0,002*

Таким чином, можна вважати, що підвищення активності глутатіон-редуктази за умов дії гострої алкогольної інтоксикації пов'язано зі збільшенням вмісту НАД⁺Н у тканинах за рахунок активації алкогольдегідрогенази.

V.V.Sokolovskaya, S.A.Petrov

GLUTATHIONE REDUCTASE ACTIVATION UNDER CONDITIONS OF ACUTE ALCOHOL INTOXICATION

Experiments carried out on rats were aimed to study the effect of acute alcohol intoxication on activity of cytoplasmic and mitochondrial forms of glutathione reductase. It has been found that alcohol activates the enzyme. The in vitro experiments have confirmed the effect. The correlation between the activity of the studied enzyme and the content of various forms of endogenous flavines is observed. It is stated that an increase in the alcohol dehydrogenase activity in tissues of rats under study induces a drastic rise of the number of restored nicotinamide coenzymes and as a result of this the glutathione reductase activity grows.

I.I.Mechnikov University, Odessa
Ministry of Education of Ukraine

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Виноградова Е.Г., Коноплицкая К.Л., Познякова Т.Н. Дисульфидан — ингибитор активности изоферментов альдегиддегидрогеназы митохондриальной фракции печени крыс // Молек. генетика и биофизика. — 1988. — 263 с.
2. Методы биохимических исследований, липидный, и энергетический обмен /Под ред. М.И.Прохоровой. — Л.: Изд-во ЛГУ, 1982. — 276 с.
3. Островский Ю.М., Сатановская В.И., Островский С.Ю., Селевич М.И. Метаболические предпосылки и последствия потребления алкоголя. — Минск: Наука и техника, 1988. — 263 с.
4. Рокицкий П.Ф. Биологическая статистика. — М.: Наука, 1973. — 206 с.
5. Соколовская В.В., Розанов А.Я., Петров С.А. Распределение и обновляемость рибофлавина в организме белых мышей в условиях острой алкогольной интоксикации // Физиол. журн. — 1991. — 37, № 1. — С. 53—57.
6. Юденфред С. Флуоресцентный анализ в биологии и медицине. — М.: Мир, 1965. — 347 с.
7. Cronholm T. Effect of ethanol on the redox state of the coenzyme bound to alcohol dehydrogenase studied in isolated hepatocytes // Biochem. J. — 1987. — 248, № 2. — P. 567—572.
8. Gonzalez X., Munos M.E., Martin M.I. et al. Influence of acute ethanol administration on hepatic glutathione metabolism in the rat // Alcohol. — 1988. — 5, № 2. — P. 103—106.
9. Lieber C.S. Biochemical and molecular basis of alcohol-induced injury to liver and other tissues // N.Engl. J.Med. — 1988. — 319, № 25. — P. 1639—1650.
10. Schaefer R.M., Sechner M., Heidland A. Alteration of water electrolyte and acid — base homeostasis in the alcoholic // Miner. and Electrolyte Metab. — 1987. — 13, № 1. — P. 1—6.

Одес. ун-т ім. І.І.Мечникова
М-ва освіти України

Матеріал надійшов
до редакції 14.07.93