

УДК 577.152.111

ИЗМЕНЕНИЕ АКТИВНОСТИ АЛКОГОЛЬДЕГИДРОГЕНАЗЫ КЛЕТОК ПЕЧЕНИ КРЫС ПРИ ДЕЙСТВИИ ЭТАНОЛА И ГЕПАРИНА

© 2010 г.

А.В. Бочкарева, Ю.В. Зимин

Нижегородский госуниверситет им. Н.И. Лобачевского

yuzimin@mail.ru

Поступила в редакцию 08.04.2010

В экспериментах по исследованию влияния этанола и предварительно введенного гепарина на активность алкогольдегидрогеназы клеток печени крыс показано, что этанол повышает, а гепарин понижает показатели активности фермента в митохондриальной и цитоплазматической фракциях клеток печени.

Ключевые слова: алкогольдегидрогеназа, клетки печени крыс, этанол, гепарин.

Введение

Известно, что гепарин, помимо антикоагулянтной активности, обладает уникальной способностью к комплексообразованию, в результате чего он может модифицировать действие различных эндогенных биологически активных веществ, в том числе энзимов. В литературе имеются данные о взаимодействии гепарина в основном с ферментами липидного обмена в сердце, печени, почках, стенке аорты, однако практически не исследовано влияние его на работу одного из основных ферментов печени – алкогольдегидрогеназы (АДГ).

АДГ катализирует окисление спиртов и восстановление альдегидов в присутствии коферментов НАД и НАДН. Это один из ключевых ферментов, участвующих в метаболизме алкоголя в организме [1].

Этиловый спирт широко распространен в живой природе. Малая диссоциация и очень слабая полимеризация небольших молекул этанола обуславливают его необычайную способность растворяться в воде и жирах и, следовательно, легко проходить через биологические мембраны. Данные свойства определяют его важную роль в физиологических и биохимических процессах, происходящих в организме. Токсическое действие экзогенного этанола на организм чрезвычайно сложно и многообразно. Введение алкоголя в зависимости от его дозы вызывает стрессовые, неспецифические реакции организма [2]. Исследования показывают, что внутрибрюшинное введение крысам этанола в дозе 4.5 мг/кг вызывает сон, средняя продолжительность которого составляет 94.0 ± 8.8 мин [3]. Окисление этанола осуществляется преимущественно в печени, где метаболизиру-

ется до 95% введенного в организм алкоголя, что приводит к изменениям в ферментных системах этого органа [4].

В связи с этим, цель данной работы – исследование особенностей изменения активности алкогольдегидрогеназы печени экспериментальных животных при введении в организм экзогенного этанола и гепарина.

Материал и методы

В исследовании использовали экстракт печени белых лабораторных нелинейных крыс-самцов массой 150–200 г. Сначала животным вводили гепарин в концентрации 250 МЕ/кг, через 20 минут внутрибрюшинно вводили этанол (4.5 г/кг), после чего животные в течение 2–4 минут теряли рефлекс переворачивания. Фиксировали время потери данного рефлекса и время его восстановления. Период нахождения крыс в боковом положении отражает время этанолового сна. Крыс после окончания эксперимента забивали декапитированием. Затем проводили исследование активности АДГ в митохондриальной и цитоплазматической фракциях, которые получали методом дифференциального центрифугирования [5]. Активность алкогольдегидрогеназы определяли в данных фракциях на микроспектрофотометре *PowerWave XS* (USA).

Определение активности фермента с использованием в качестве субстрата этанола (прямая реакция). Окисление этилового спирта под действием АДГ сопровождается восстановлением НАД. В спектрофотометрическую кювету помещали 2.7 мл 100 мМ глицинового буфера (рН 9.6); 0.1 мл раствора, содержащего

Таблица

Время этанолового сна (мин) у крыс и изменение его продолжительности при предварительном введении гепарина

Группа	Этанол 4.5 г/кг	Гепарин 250 МЕ/кг + этанол 4.5 г/кг
Продолжительность этанолового сна	94.0±8.8	42.1±3.0***

Примечание: достоверное отличие от группы этанол: *** – $p < 0.001$

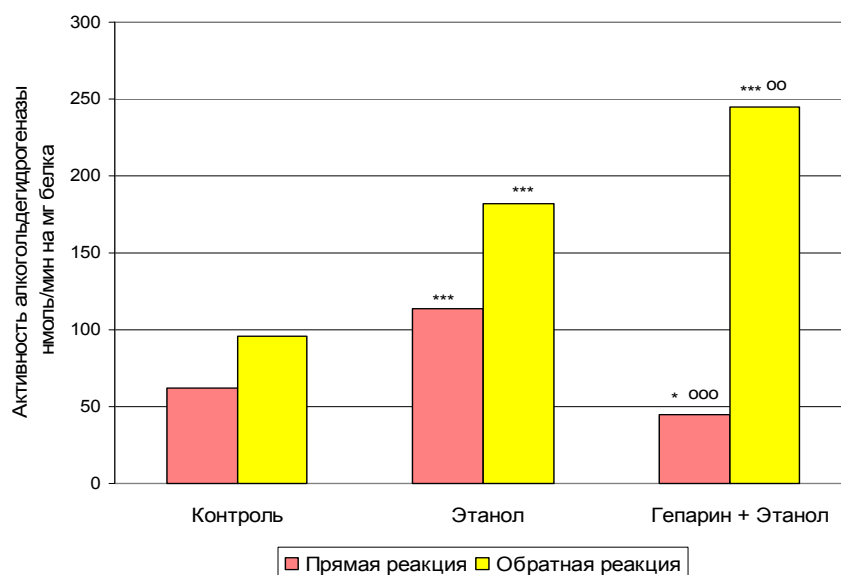


Рис. 1. Активность алкогольдегидрогеназы в митохондриальной фракции клеток печени крыс при введении этанола и действии гепарина + этанола. Достоверное отличие от контрольной группы: * – $p < 0.05$, *** – $p < 0.001$. Достоверное отличие от группы этанол: °° – $p < 0.01$, °°° – $p < 0.001$

фермент; 0.1 мл 30 мМ раствора этанола; 0.1 мл 20 мМ раствора НАД. Содержимое кюветы быстро перемешивали и измеряли увеличение оптической плотности при 340 нм через каждые 15 секунд в течение 3 минут. Расчет активности фермента проводили по формуле (1):

$$\text{Активность} = (\Delta E \cdot V) / (\epsilon \cdot B \cdot T \cdot L), \quad (1)$$

где ΔE – разница экстинкции до начала реакции и через 1 минуту после; V – объем проб, равный 3 мл; ϵ – молярный коэффициент экстинкции НАДН – $6.22 \cdot 10^6$; B – содержание белка в пробе в мг (или ткани в граммах); T – время, за которое исследуется реакция – 1 мин; L – толщина слоя исследуемого раствора, равная 1 см.

Активность АДГ выражали в нмоль НАДН за 1 мин на 1 мг белка.

Определение активности фермента с использованием в качестве субстрата ацетальдегида (обратная реакция). Активность АДГ оценивали по скорости окисления НАДН, которая регистрируется спектрофотометрически по убыли величины оптической

плотности при длине волны 340 нм. В спектрофотометрическую кювету помещали 2.7 мл 100 мМ фосфатного буфера (рН 7.4); 0.1 мл раствора, содержащего фермент; 0.1 мл 23 мМ раствора ацетальдегида; 0.1 мл 5 мМ раствора НАДН. Содержимое кюветы быстро перемешивали и измеряли увеличение оптической плотности при 340 нм через каждые 15 секунд в течение 3 минут. Расчет активности фермента проводили по формуле (1). Активность АДГ выражали в нмоль НАДН за 1 мин на 1 мг белка.

Статистическая обработка результатов была проведена с применением t -критерия Стьюдента с использованием программы *Primer of Biostatistics, 4th Edition, S.A. Glantz, McGraw-Hill*.

Результаты и их обсуждение

Предварительное введение экспериментальным животным гепарина приводило к уменьшению продолжительности этанолового сна (таблица).

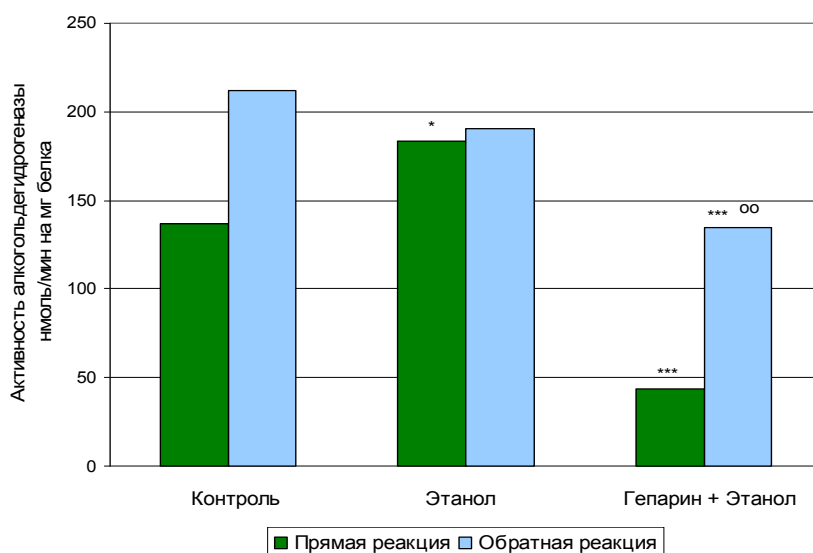


Рис. 2. Активность алкогольдегидрогеназы в цитоплазматической фракции клеток печени крыс при введении этанола и действии гепарина + этанола. Пояснения – под рис. 1

Введение крысам этанола при предварительном введении гепарина приводило, в основном, к снижению активности данного фермента (рис. 1, 2). В митохондриальной фракции показатель активности алкогольдегидрогеназы (прямая реакция) составил 44.6 ± 5.2 нмоль/мин на мг белка, что достоверно ($p < 0.05$) ниже по сравнению с показателями контроля (61.7 ± 5.2 нмоль/мин на мг белка) в 1.4 раза (рис. 1). В цитоплазматической фракции клеток печени активность фермента в прямой реакции в группе гепарин + этанол составила 43.6 ± 2.9 нмоль/мин на мг белка, что достоверно ($p < 0.001$) ниже по сравнению с контролем (136.8 ± 7.8 нмоль/мин на мг белка) в 3.1 раза, в обратной – 134.5 ± 8.1 нмоль/мин на мг белка, что также достоверно ($p < 0.001$) ниже данных контрольной группы (212.2 ± 12.1 нмоль/мин на мг белка) в 1.6 раза (рис. 2). Повышение активности алкогольдегидрогеназы наблюдалось в обратной реакции в митохондриальной фракции клеток печени. Здесь показатель активности фермента составил 245.0 ± 9.1 нмоль/мин на мг белка, что достоверно ($p < 0.001$) выше контрольных показателей (96.1 ± 6.1 нмоль/мин на мг белка) в 2.5 раза (рис. 1).

Предварительное введение животным гепарина приводило к снижению значений активности алкогольдегидрогеназы в данных субклеточных фракциях печени крыс группы гепарин + этанол по сравнению с группой, которой вводился этанол (рис. 1, 2). В митохондриальной фракции показатель ферментативной активности в прямой реакции был достоверно

($p < 0.001$) ниже данных группы этанола (114.1 ± 8.6 нмоль/мин на мг белка) в 2.6 раза (рис. 1). В цитоплазматической фракции клеток печени активность алкогольдегидрогеназы в прямой реакции в группе гепарин + этанол была достоверно ($p < 0.001$) ниже по сравнению с показателями группы этанола (183.1 ± 22.1 нмоль/мин на мг белка) в 4.2 раза, в обратной – также достоверно ($p < 0.01$) ниже данных группы этанола (190.7 ± 17.4 нмоль/мин на мг белка) в 1.4 раза (рис. 2). Повышение активности алкогольдегидрогеназы наблюдалось в обратной реакции в митохондриальной фракции клеток печени группы гепарин + этанол по сравнению с группой этанола (181.8 ± 17.6 нмоль/мин на мг белка): здесь показатель активности фермента был достоверно ($p < 0.01$) выше в 1.3 раза (рис. 1).

Таким образом, внутрибрюшинное введение экспериментальным животным этанола в основном повышает показатели активности алкогольдегидрогеназы в митохондриальной и цитоплазматической фракциях клеток печени, в то время как предварительное введение гепарина приводит к снижению показателей ферментативной активности.

Заключение

Проведенные исследования показали, что этанол (4.5 мг/кг) и гепарин (250 МЕ/кг) существенно изменяют активность алкогольдегидрогеназы печени экспериментальных животных, при этом введение этанола достоверно повышает показатели активности фермента по сравне-

нию с интактными животными, а предварительное введение гепарина вызывает противоположный эффект. Однако в обратной алкогольдегидрогеназной реакции в митохондриальной фракции клеток печени наблюдалось максимальное увеличение активности фермента в 2.5 раза при действии гепарина.

Список литературы

1. Zakhari S. Overview: how is alcohol metabolized by the body // *Alcohol Res. Health*. 2006. V. 29. № 4. P. 245–254.

2. Wachtel E., Borochoy N., Bach D., Miller I.R. The effect of ethanol on the structure of phosphatidylserine bilayers // *Chem. Phys. Lipids*. 1998. V. 92. № 2. P. 127–137.

3. Буров Ю.В., Ведерникова Н.Н. Нейрохимия и фармакология алкоголизма. М.: Медицина, 1985. 232 с.

4. Косенко Е.А., Каминский Ю.Г. Углеводный обмен, печень и алкоголь. Пущино: МГУ им. Ломоносова, 1988. 148 с.

5. Эванз У.Г. Органеллы и мембраны животной клетки // В кн.: Биологические мембраны. Методы. Пер. с англ. / Под ред. Дж. Б. Финдлея, У.Г. Эванза. М.: Мир, 1990. С. 13–61.

**CHANGES IN ALCOHOL DEHYDROGENASE ACTIVITY
OF RAT LIVER CELLS UNDER ETHANOL AND HEPARIN ACTION**

A.V. Bochkareva, Yu.V. Zimin

The experiments on the action of 4.5 mg/kg ethanol and preinjected 250 IU/kg heparin on rat liver alcohol dehydrogenase activity have shown that ethanol increases and heparin decreases the indices of the enzyme activity in mitochondrial and cytoplasmic fractions of liver cells.

Keywords: alcohol dehydrogenase, rat liver, ethanol, heparin.