

УДК 577.151.08.615.246

©Коллекти авторов

ВЛИЯНИЕ ПИРУВАТА, ТРЕОНИНА И ФОСФОЭТАНОЛАМИНА НА ОБМЕН ЭНДОГЕННОГО АЦЕТАЛЬДЕГИДА У КРЫС С ТОКСИЧЕСКИМ ПОРАЖЕНИЕМ ПЕЧЕНИ

П.С. Пронько¹, В.И. Сатановская¹, Б.И. Горенштейн¹, А.Б. Кузьмич¹,
Т.Н. Пыжик²

¹Институт Биохимии НАН Беларуси, Бульвар Ленинского Комсомола, 50,
Гродно, 230017 Беларусь; факс:(152) 33-4121.

²Гродненский государственный медицинский университет, ул. Горького, 80,
Гродно, 230015 Беларусь; факс:(152) 33-5341.

В ходе реакций, катализируемых пируватдегидрогеназой, треонинальдолазой и этаноламинфосфатфосфолиазой, в тканях млекопитающих может продуцироваться ацетальдегид. Мы изучали влияние введения субстратов этих ферментов: пирувата (500 мг/кг, в/б), треонина (500 мг/кг, в/б) и фосфоэтанолamina (230 мг/кг, в/б) здоровым крысам и животным с токсическим повреждением печени, вызванным четыреххлористым углеродом (CCl₄, 0,2 мл на крысу, в/б, 2 раза в неделю в течение 4 недель) на концентрации эндогенного ацетальдегида и этанола в крови, активность алкогольдегидрогеназы, альдегиддегидрогеназы, пируватдегидрогеназы, треонинальдолазы и этаноламинфосфатфосфолиазы, трансаминаз и глутаматдегидрогеназы в печени. Введение CCl₄ приводило к достоверному снижению активности алкогольдегидрогеназы (в пересчёте на вес ткани) и альдегиддегидрогеназы печени, достоверному повышению концентрации эндогенного этанола в печени и тенденции к повышению уровня ацетальдегида в крови крыс. У животных с токсическим поражением печени пируват через 30 мин после введения повышал активность пируватдегидрогеназы печени, треонин снижал активность треонинальдолазы, а фосфоэтанолamin снижал активность этаноламинфосфатфосфолиазы. Через 30 мин после введения пирувата повышался уровень эндогенного ацетальдегида в крови крыс, получавших CCl₄, а треонин в те же сроки повышал содержание ацетальдегида в крови здоровых животных. Концентрация эндогенного этанола в крови контрольных и опытных крыс достоверно возросла после введения фосфоэтанолamina. Тот факт, что пируват способствует повышению уровня ацетальдегида в крови, подтверждает его роль наряду с треонином в качестве физиологического источника эндогенного ацетальдегида. Поражение печени CCl₄ приводило к снижению активности альдегиддегидрогеназы, что способствует накоплению ацетальдегида, происходящего из эндогенных источников, включая деградацию пирувата и треонина, и делает этот орган чувствительным и к другим экзогенным факторам (особенно алкогольной интоксикации).

Ключевые слова: поражение печени четыреххлористым углеродом, эндогенный ацетальдегид, пируват, треонин, фосфоэтанолamin, этанол.

ВВЕДЕНИЕ. Ацетальдегид - продукт окисления этанола - образует аддукты с белками, нуклеиновыми кислотами, вмешивается в энергетический обмен, изменяет клеточные функции. Ему отводят важную роль в патогенезе алкогольного поражения органов (в частности, печени [1].) Ранее было показано, что увеличение содержания аддуктов ацетальдегида с белками происходит не только у алкоголиков, но и у пациентов с неалкогольным поражением печени [2]. Это свидетельствует о том, что ацетальдегид, образующийся эндогенно из физиологических источников, также может оказывать токсическое действие. При поражении печени четыреххлористым углеродом (CCl₄) продемонстрирована роль

треонинальдолозной реакции в повышении уровня эндогенного ацетальдегида [3]. Это подтверждает существование физиологических источников эндогенного ацетальдегида. Известен ряд ферментативных реакций, в ходе которых в организме человека и животных может образовываться ацетальдегид. Кроме эндогенного этанола, который окисляется алкогольдегидрогеназой (АДГ) печени в ацетальдегид [4], предшественниками ацетальдегида могут быть и другие эндогенные субстраты. Пируватдегидрогеназа (ПДГ, КФ 1.2.4.1), этаноламинфосфатфосфолиаза (ЭАФЛ, КФ 4.2.99.7), треонинальдолоаза (ТрА, КФ 4.1.2.5), 5-дезоксипентозофосфатальдолоаза (КФ 4.1.2.4) и другие ферменты катализируют реакции, приводящие к образованию эндогенного ацетальдегида в тканях млекопитающих [5]. Роль эндогенного ацетальдегида в метаболизме окончательно не установлена, как и значимость каждого из возможных путей его образования. В физиологических условиях существует равновесие между ферментативными реакциями, образующими ацетальдегид, и реакциями его окисления альдегиддегидрогеназами (АльдГ), представленными во всех тканях [6]. Возможно, восстановление ацетальдегида в редуктазных реакциях также способствует его удалению. Результатом этих процессов является очень низкий уровень эндогенного ацетальдегида, что создает методические трудности при его определении [7]. Однако токсическое повреждение печени, хронические заболевания этого органа снижают активность АльдГ и изменяют активность ферментов, являющихся потенциальными продуцентами ацетальдегида, что может нарушить метаболическое равновесие и повысить уровень эндогенного ацетальдегида [3]. Длительное совместное введение CCl_4 и этанола вызывает тяжёлое повреждение печени (развитие фиброза и цирроза) у крыс, что обычно не наблюдается при раздельном введении каждого из соединений в тех же дозах [8]. Механизмы потенцирующего действия CCl_4 на развитие повреждения печени при алкогольной интоксикации требуют дополнительного изучения.

Целью настоящей работы явилось изучение активности ферментов наработки и деградации эндогенного ацетальдегида в печени крыс при поражении этого органа CCl_4 и влияния дополнительного введения субстратов-предшественников эндогенного ацетальдегида (пирувата, треонина, фосфоэтаноламина) на уровень эндогенного ацетальдегида и этанола.

МЕТОДИКА. В эксперименте использованы белые крысы самцы гетерогенной популяции (Рапполово, Санкт-Петербург, Россия) массой 160-200 г, содержащиеся на стандартном рационе вивария и имевшие свободный доступ к воде. В течение месяца опытным животным ($n=32$) 2 раза в неделю вводили в/бр CCl_4 в дозе 0,2 мл/200 г массы тела в 0,5 мл оливкового масла, контрольные животные ($n=12$) получали аналогично инъекции оливкового масла. На четвертой неделе после начала введения CCl_4 определяли время максимального эффекта от введения препаратов. Опытных и контрольных крыс разделяли на группы по 6 животных в каждой и вводили им однократно пируват натрия (500 мг/кг, в/бр), или треонин (500 мг/кг, в/бр), или фосфоэтаноламин (ФЭА 230 мг/кг, в/бр). В течение дня обрабатывали одну опытную группу со своим контролем, через 30 и 60 мин после введения препаратов у животных из надреза кончика хвоста брали кровь и измеряли уровни эндогенного ацетальдегида и эндогенного этанола. Далее на 3-й день после окончания введения CCl_4 опытных крыс разделяли на 4 группы и вводили 1-й - 0,9% раствор хлорида натрия, второй - пируват натрия (500 мг/кг, в/бр), 3-й - треонин (500 мг/кг, в/бр), 4-й - ФЭА (230 мг/кг, в/бр). Контрольным животным, которые получали в течение месяца оливковое масло, вводили 0,9% раствор хлорида натрия. Через 30 минут крыс декапитировали, печень быстро извлекали и использовали для выделения субклеточных фракций, часть замораживали в жидком азоте, где она хранилась до анализа.

В супернатанте печени (20000 g, 1 час) определяли общую активность альдегиддегидрогеназы (АльдГ), представляющую сумму активностей ферментов с высокой и низкой K_m к альдегидам, с 5 мМ ацетальдегидом в качестве субстрата

при 25°C по наработке NADH [9]. Активность АльДГ измеряли в присутствии детергента дезоксихолата натрия (0,25 мг/1 мг белка), который влияет на определение белка при использовании метода Лоури. Поэтому для расчета активности АльДГ определение концентрации белка проводили по специальной калибровке в присутствии дезоксихолата натрия. Скорость прямой реакции алкогольдегидрогеназы (АДГ) определяли в супернатанте печени (20000 g, 1 час) с этанолом в качестве субстрата при pH 9,6 по образованию NADH (дегидрогеназная активность), а скорость обратной реакции - по убыли NADH в среде, содержащей 5 мМ ацетальдегид, при pH 6,4 (редуктазная активность) спектрофотометрически при 25 °C [10]. Из свежей печени выделяли митохондрии, где определяли декарбоксилазную активность пируватдегидрогеназы (ПДГ) радиометрическим методом [11] с использованием в качестве субстрата пирувата натрия (11 мМ) и $[1-^{14}\text{C}]$ пирувата (1,6 мМ, 2,37 кБк/ммоль) по количеству образовавшегося $^{14}\text{CO}_2$; радиоактивность измеряли на жидкостном сцинтилляционном счётчике Mark-II. Активность глутаматдегидрогеназы (ГДГ) [12] определяли в митохондриях, а активности аспартат- и аланин-аминотрансфераз (АСТ, АЛТ) [13] в митохондриях и гиалоплазме печени (105 000 g, 1 час). В гиалоплазме печени оценивали также активность треонинальдолазы (ТрА) с 100 мМ треонином в качестве субстрата [14] и этаноламинфосфатфосфолиазы (ЭАФЛ) с 3,78 мМ фосфоэтанолом [15]. Скорость обеих ферментативных реакций измеряли по образованию ацетальдегида. С помощью газовой хроматографии определяли уровень эндогенного этанола в крови и печени [16] и концентрацию ацетальдегида в крови и инкубационной среде при определении активности ТрА и ЭАФЛ [17]. Содержание молочной и пировиноградной кислот определяли в цельной крови [18].

Концентрацию белка измеряли по методу Лоури [19]. Удельную активность ферментов выражали в нмоль образовавшегося продукта/мин на мг белка (mU).

Результаты обработаны статистически с использованием t-критерия Стьюдента и F критерия Фишера.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ. Хроническая интоксикация CCl_4 привела к достоверному повышению активности АЛТ в плазме крови крыс (табл. 1), что свидетельствует о поражении мембран гепатоцитов. У опытных животных достоверно снизилась активность митохондриальной АСТ, активность глутаматдегидрогеназы была снижена примерно на 17% во всех группах, получавших CCl_4 (табл. 1), очевидно, вследствие повреждения митохондрий, что характерно для поражения печени различными гепатотоксинами [20]. Белок печени был достоверно снижен после обработки CCl_4 по сравнению с контролем ($P<0,001$; табл. 1). У опытных животных достоверно увеличился по сравнению с контрольной группой как абсолютный ($6,9\pm0,3$ и $6,1\pm0,2$ г, $P<0,05$), так и относительный вес печени ($3,80\pm0,11$ и $3,20\pm0,06$ г/100 г веса тела, $P<0,001$). Эти изменения совпадают с описанными ранее для крыс, получавших CCl_4 в аналогичной дозировке. Морфологически повреждение печени проявлялось у них стеатозом, точечным некрозом, воспалением и фиброзом [3].

Активность АДГ печени (дегидрогеназная: контроль $0,62\pm0,04$; опыт $0,47\pm0,04$ мкмоль/мин на г ткани, $P<0,05$ и редуктазная: контроль $4,21\pm0,20$, опыт $3,27\pm0,28$ мкмоль/мин на г ткани, $P<0,02$) была снижена после введения CCl_4 при этом активность АДГ у этих животных достоверно не отличалась от контрольных величин (опыт - $3,81\pm0,2$; контроль - $3,23\pm0,28$ мкмоль/мин/вес печени в г) в связи с развитием гепатомегалии. Удельная активность АДГ, рассчитанная на мг белка, существенно не отличалась у крыс, обработанных CCl_4 , по сравнению с контролем (табл.1). В то же время, общая активность АльДГ, которая отражает суммарную активность изоферментов с высокой и низкой КМ к ацетальдегиду, была достоверно снижена у крыс с токсическим поражением печени, по видимому, за счет изофермента с низкой КМ к альдегидам. Активность пируватдегидрогеназы, треонинальдолазы и этаноламинфосфатфосфолиазы - ферментов, продуцирующих эндогенный ацетальдегид, в этой же группе животных существенно не менялась (табл. 1).

Таблица 1. Влияние введения пирувата, треонина и фосфоэтаноламина на биохимические показатели в крови и печени крыс с хроническим токсическим гепатитом, индуцированным четырёххлористым углеродом.

Ферменты	Интактный контроль (12)	Хроническая интоксикация CCl ₄			
		0,9% NaCl (11)	Пируват (8)	Треонин (6)	ФЭА (6)
	Печень				
АДГ-Э	6,8±0,4	6,06±0,5	7,3±0,3	6,3±0,7	5,8±0,3
АДГ-АА	45,9±1,8	41,8±3,5	51,4±3,3	38,9±5,3	43,2±1,4
АльдГ-общая	5,1±0,4	3,7±0,4*	3,8±0,8	4,0±0,6	2,9±0,3*
Белок (мг/г ткани)	97±2	81±2*	83±3*	81±3*	88±3*
ЭАФ-лиаза гиалоплазма	54,7±11,6	80,7±20,5	95,3±20	17,8±6,3**	34,7±9,3
ТрА гиалоплазма	0,17±0,003	0,18±0,004	0,28±0,07*	0,07±0,009*	0,10±0,01*
ПДГ митохондрии	13,0±0,9	12,0±1,3	22,0±3,0**	10,0±1,3	17,0±2,6
ГДГ митохондрии	6,0±0,8	5,0±0,5	5,0±0,6	5,0±1,0	5,0±0,6
АСТ митохондрии	19,0±2,2	13,0±2,0*	12,0±1,58*	10,0±1,5*	25,0±1,7**
АСТ гиалоплазма	37±3	38±4	36±4	24±2*	52±4*
АЛТ митохондрии	21,4±1,4	20±1,7	26,3±3	15±1,5*	31±2
АЛТ гиалоплазма	101±6	76±6*	93±5	54±4* *	99±5*
Кровь					
АСТ- плазма	0,39±0,03	0,50±0,05	-	0,40±0,06	0,50±0,05
АЛТ- плазма	0,39±0,05	0,83±0,13*	0,96±0,40	0,80±0,18*	1,10±0,11*
ПК (мМ)	0,09±0,005	0,09±0,007	0,10±0,012	0,10±0,01	0,09±0,01
МК (мМ)	1,7±0,1	1,8±0,15	1,9±0,1	2,3±0,2*	1,7±0,13
МК/ПК	20,1±1	20±1	21±2,4	25±2,0*	21±1,6

Примечание. Достоверность отличий указана по сравнению с контролем (* - $P < 0,05-0,01$) и опытной группой, получавшей CCl₄ и физиологический раствор (+- $P < 0,01-0,001$). Активность ферментов выражена в МЕД.

Через 3 недели после начала введения CCl₄ уровень эндогенного ацетальдегида в крови повысился в 1,5 раза от 0,50±0,14 мкМ (в контроле) до 0,74±0,16 мкМ (в опытной группе). После месячной интоксикации CCl₄ ацетальдегид в крови также был повышен в 1,2 раза, но недостоверно (табл. 2). Уровни эндогенного ацетальдегида в цельной крови колебались в пределах от 0 до 1,8 мкМ в контрольной группе и от 0 до 3,8 мкМ в опытной группе. Концентрации эндогенного ацетальдегида были ниже чувствительности метода определения у 47 % контрольных крыс и у 32 % опытных животных. Эти уровни соответствуют полученным в других лабораториях с помощью жидкостной и газовой хроматографии [7].

Таблица 2. Концентрация эндогенного ацетальдегида и этанола в крови и печени крыс с хроническим токсическим гепатитом, индуцированным четырёххлористым углеродом, через 30 минут после введения пирувата, треонина и фосфоэтаноламина.

Как видно из таблицы 2, в печени опытных крыс с интоксикацией CCl₄ концентрация эндогенного этанола была существенно выше по сравнению с

Группы	Ацетальдегид крови (мкМ)	Этанол крови (мкМ)	Этанол печени (мкМ)
Контроль	0,66±0,15	13,6±2,2	4,6±1,3
CCl ₄	0,81±0,21	12,9±2,3	13,1±2,6**
CCl ₄ + пируват	1,34±0,26*	16,6±3,6	10,8±3,6
CCl ₄ + треонин	0,84±0,20	19,2±5,2	10,6±3,5
CCl ₄ + ФЭА	0,92±0,29	43,7±8,4***	7,9±2,9

Примечание. Достоверность отличий указана по сравнению с контролем (* - $P < 0,05$; ** $P < 0,01$) и опытной группой, получавшей CCl₄ и физиологический раствор (+- $P < 0,001$).

контролем, в крови этих животных только фосфоэтанолламин достоверно повышал уровень эндогенного этанола.

Изучение влияния субстратов-предшественников эндогенного ацетальдегида на динамику изменения уровня эндогенных ацетальдегида и этанола в крови крыс проведено после трех недель интоксикации CCl_4 . Через 30 и 60 мин после введения пирувата у опытных животных выявлена выраженная тенденция к повышению концентрации эндогенного ацетальдегида по сравнению с исходным уровнем (табл. 3). Группы, получавшие пируват, существенно отличались по величине дисперсии через 30 мин ($F=3,837$, $DFn=7$, $Dfd=7$, $P<0,05$) и 60 мин после введения препарата ($F=6,3$, $DFn=7$, $Dfd=7$, $P<0,02$). Назначение пирувата после месячной интоксикации CCl_4 привело к достоверному повышению концентрации эндогенного ацетальдегида через 30 мин после его введения (табл. 2). Активность пируватдегидрогеназы митохондрий печени после введения пирувата достоверно повысилась (табл. 1). Следует отметить, что введение пирувата приводило к повышению активности еще одного фермента, способного продуцировать ацетальдегид - треонинальдолазы. Возможно, повышенная продукция эндогенного ацетальдегида в пируватдегидрогеназной реакции из пирувата и треонинальдолазной из треонина не компенсируется его утилизацией в ацетат при

Таблица 3. Концентрация эндогенного ацетальдегида крови в различные сроки после введения пирувата, треонина и фосфоэтанолламина контрольным крысам и животным, получавшим четыреххлористый углерод в течение трех недель

Воздействие	Концентрация ацетальдегида, мкМ		
	Контроль	30 мин	60 мин
Пируват (n=6)	0,68±0,32	1,04±0,4	0,60±0,21
CCl_4 + пируват (n=8)	0,52±0,20	1,41±0,39	1,59±0,50
Треонин (n=6)	0,04±0,04	0,61±0,19*	0,27±0,13
CCl_4 + треонин (n=6)	0,46±0,13	0,70±0,23	0,43±0,13
ФЭА (n=6)	0,78±0,21	0,85±0,27	0,76±0,18
CCl_4 + ФЭА (n=6)	1,34±0,33	1,03±0,37	1,2±0,44

Примечание. Достоверность отличий (* - $P<0,05$) указана по сравнению с контролем

участии АльДГ, активность которой проявила достоверную тенденцию к снижению во всех группах, получавших CCl_4 , (табл. 1).

Ацетальдегид, образующийся при декарбоксилировании пирувата, может восстанавливаться в этанол [5]. После введения пирувата уровень эндогенного этанола достоверно повышался только у интактных животных (табл. 4). Эффекты пирувата в наших экспериментах были кратковременными, что, вероятно, обусловлено способностью этого соединения превращаться в интермедиаты цикла трикарбоновых кислот, в аминокислоты и лактат. Ранее нами было показано [21], что введенный животным в аналогичной дозе пируват способствовал накоплению аланина в печени, очевидно, через реакции переаминирования.

Треонин достоверно повысил уровень эндогенного ацетальдегида у интактных животных в крови, взятой *in vivo* через 30 мин после его введения (табл. 3), у них достоверно изменилась и вариабельность показателя ($F=28,61$; $DFn=5$; $Dfd=5$, $P=0,001$). Сходный результат был получен ранее [3], но в нашем эксперименте треонин оказался менее эффективным на фоне поражения печени CCl_4 . Возможно, это связано с тем, что в условиях нашего эксперимента треонин вызвал торможение треонинальдолазы и этаноламинфосфатфосфолиазы печени, ферментов, которые участвуют в продукции ацетальдегида (табл. 1). Хотя треонинальдолаза, расщепляющая треонин на глицин и ацетальдегид в цитоплазме гепатоцитов, представляет минорный путь деградации треонина [22], ее роль может возрастать при поражении печени, когда страдают основные пути превращения треонина, катализируемые митохондриальной треониндегидрогеназой и цитозольной треониндегидратазой [3].

У крыс, получавших треонин на фоне поражения печени CCl_4 , снизилась

Таблица 4. Концентрация эндогенного этанола в крови в различные сроки после введения пирувата, треонина и фосфоэтаноламина интактным крысам и животным, получавшим четырёххлористый углерод в течение трёх недель.

Воздействие	Концентрация этанола, мкМ		
	Контроль	30 мин	60 мин
Пируват (n=6)	7,1±1,5	22,8±6,1*	9,4±1,2
CCl ₄ + пируват (n=6)	12,2±2,1	18,2±6,6	10,8±1,8
Треонин (n=6)	9,5±5,2	15,5±7,8	7,9±3,2
CCl ₄ + треонин (n=6)	10,7±3,2	12,1±6,5	19,3±4,6
Фосфоэтаноламин (n=6)	11,3±5,2	26,7±6,3*	19,3±3,5
CCl ₄ + фосфоэтаноламин (n=6)	12,7±3,9	14,2±3,0	15,7±2,4

Примечание. Достоверность отличий (* - $P < 0,05$) указана по сравнению с контролем

активность АСТ и АЛТ в митохондриях и гиалоплазме печени, достоверно повысились уровень лактата в плазме крови и соотношение лактат/пируват (табл. 1). Эти изменения можно объяснить участием треонина в реакциях переаминирования.

После введения ФЭА концентрация эндогенного ацетальдегида в крови здоровых и получавших CCl₄ крыс не менялась (табл. 2, 3). В то же время, введение ФЭА вызывало значительное повышение уровня эндогенного этанола крови у интактных животных через 30 минут (парный t-тест, $P < 0,05$), через 60 минут этот показатель снизился, но оставался на 70% выше исходного уровня (табл. 4). Нагрузка ФЭА через 1 месяц от начала введения CCl₄ крысам (табл. 2) достоверно повышала уровень эндогенного этанола крови по сравнению с интактным контролем ($P < 0,01$) и опытными животными, получавшими только CCl₄ ($P < 0,001$). Механизм этого эффекта не ясен, но известно, что после введения ФЭА в тканях повышается уровень этаноламина [21], который является ингибитором АДГ [5]. Можно предположить, что повышение уровня эндогенного этанола при введении фосфоэтаноламина крысам связано с ингибированием АДГ накапливающимся в ткани печени этаноламином.

Ранее было высказано предположение о том, что пируват является предшественником эндогенного ацетальдегида; оно базировалось на косвенных данных о способности пирувата повышать концентрацию эндогенного этанола в короткие сроки после его введения у крыс [21]. В модельных условиях поражения печени CCl₄ нами получены прямые подтверждения того, что пируват способен регулировать уровень эндогенного ацетальдегида *in vivo*.

Наряду с другими альдегидами, образующимися в организме в процессе метаболизма, токсичные альдегидные продукты перекисного окисления липидов являются субстратами АльДГ. Известно, что свободные радикалы и индуцированная ими перекисная окисление липидов играют важную роль в поражении печени, вызванном CCl₄. Введение этого соединения крысам приводит к увеличению экскреции с мочой малонового диальдегида и целого ряда липофильных альдегидов, что связывают с развитием окислительного стресса [23]. Вероятно, ингибирование АльДГ под действием CCl₄ также играет определенную роль в этом процессе. Как и хроническое воздействие CCl₄ в нашем эксперименте, однократное введение CCl₄ крысам сопровождалось снижением активности АльДГ при неизменном уровне активности АДГ печени, одновременно в этом органе отмечено значительное повышение концентрации 4-гидрокси-2-ноненаля и гексеналя [24]. Активность АльДГ отрицательно коррелировала с накоплением гексеналя в ткани печени опытных животных [24].

Показано, что CCl₄ усиливает токсичность этанола при хроническом введении обоих соединений [8]. Тяжесть фиброза в печени существенно зависела как от дозы алкоголя, так и от дозы CCl₄ при их совместном введении [8]. Хотя сам этанол не способен вызывать цирроз печени у грызунов, он существенно усиливал циррозогенный и туморогенный эффект CCl₄. Ацетальдегид усиливал способность CCl₄ вызывать цирроз печени [25]. Одним из механизмов действия CCl₄ может

быть отмеченное нами снижение активности АльДГ печени. При сочетанном действии этанола и CCl_4 будет происходить накопление токсичного и реакционноспособного ацетальдегида, который способен образовывать аддукты с белками, вызывая образование антител, инактивацию ферментов, нарушение репарации ДНК, а также снижать уровень восстановленного глутатиона и нарушать другие механизмы антиоксидантной защиты [1]. Злоупотребление алкоголем у лиц, контактирующих с CCl_4 и его парами в промышленности, по нашему мнению, будет увеличивать риск поражения печени.

Таким образом, у крыс с поражением печени после хронического введения CCl_4 в условиях, когда активность ферментов, продуцирующих эндогенный ацетальдегид (АДГ, пируватдегидрогеназы, треонинальдолазы, этаноламинфосфат фосфолиазы) не меняется, фактором, способствующим накоплению эндогенного ацетальдегида в крови, становится пониженная активность фермента его деградации - АльДГ. Введение субстратов-предшественников эндогенного ацетальдегида (пирувата, треонина и фосфозаноламина) крысам с поражением печени показало, что пируват способствует повышению уровня ацетальдегида в крови, подтверждая его роль наряду с треонином в качестве физиологического источника эндогенного ацетальдегида. Ингибирование активности АльДГ при токсическом поражении печени CCl_4 делает этот орган чувствительным и к другим экзогенным факторам, алкогольная интоксикация на таком фоне приведет к накоплению токсичного ацетальдегида и усугубит повреждение печени.

Работа выполнена при поддержке гранта Международного научного фонда (MW 2000).

ЛИТЕРАТУРА

1. Lieber C.S. (1998). J. Stud. Alcohol. **59**, 9-25.
2. Matthewson K., Almardini H., Barlett K. et al. (1986). Gut. **27**, 756-764.
3. Ma X-Li, Baraona E., Hernandez-Munoz R., Lieber C.S. (1989). Hepatology. **10**, No 9, 933-940.
4. Krebs H.A., Perkins J.R. (1970). Biochemical J. **118**, 635-644.
5. Островский Ю.М., Сатановская В.И., Островский С.Ю. и др. (1988). Метаболические предпосылки и последствия потребления алкоголя. Мн., Наука и техника.
6. Weiner H., Wang X. (1994) Alcohol and Alcoholism, Suppl. No 2 141-146.
7. Baraona E., Di Padova C., Tabasco J., Lieber C. (1987). Life Sci. **40**, 253-258.
8. Plummer J.L., Hall P.D., J.L., Ilesley A.H. et al. (1994) Alcohol. Clin. Exp. Res. **18**, 1523-1526.
9. Tottmar S.O.C., Petersson H., Kiessling K.H. (1973). Biochem. J. **135**, 577-586.
10. Bonnichsen P.K., Brink N.G. (1955). Meth. Enzymol., **1**, 495-500.
11. Gubler C.J. (1961). J. Biol. Chem., **236**, 3112-3120.
12. Schmidt E. (1962). In: Methoden der Enzymatischen Analyse. (Bergmeyer H.U., ed.) Verlag-Chemie, Weinheim/Bergstr., pp.752-764.
13. Колб В.Г., Камышников В.С. (1982). Клиническая биохимия. Минск, Беларусь.
14. Горенштейн Б.И., Геращенко Д.Ю., Островский Ю.М. (1991). Доклады АН БССР, **35**, № 12, 1127-1129.
15. Пыжик Т.М., Геращенко Д.Ю., Островский Ю.М. (1991). Весці. АН БССР, серыя. біял. навук. № 6, 45-47.
16. Пронько П.С., Тарасов Ю.А., Шышкин С.М., Островский Ю.М. (1987). Известия Академии наук БССР, Сер. биол. наук № 2, 79-82.
17. Пронько П.С., Кузьмич А.Б., Зиматкин С.М. (1993). Вопросы наркологии, № 4, 40-42.

18. *Bergmeyer H.U.* (1962). Methoden der enzymatischen analyse. Verlag-Chemie, Weinheim/Bergstr.
19. *Lowry O.H., Rosebrough N.Y., Farr A.L., Randall R.Y.* (1951). J. Biol. Chem., **193**, 265-275.
20. *Покровский А.А.* (1974) Роль биохимии в развитии науки о питании. М.: Наука.
21. *Горенштейн Б.И., Геращенко Д.О., Островский С.Ю. и др.* (1993). Известия АН Беларуси. Серия биол. наук, № 4, 32-37.
22. *Bird M.I., Nunn P.B.* (1983) Biochem. J. 214, 687-694.
23. *Draper H.H., Csallany A.S., Hadley M.* (2000). Free Radic. Biol. Med. **29**, 1071-1077.
24. *Fujita M., Sano M., Yoshino K., Tomita I.* (1994). Biochem. Mol. Biol. Int. **32**, 429-434.
25. *Cho K.J., Jang J.J.* (1993) Cancer Lett. **70**, 33-39.

Поступила 02.04.01.

EFFECT OF PYRUVATE, THREONINE AND PHOSPHOETHANOLAMINE ON BLOOD ENDOGENOUS ACETALDEHYDE METABOLISM IN RATS WITH TOXIC LIVER INJURY

*P.S. Pronko¹, V.I. Satanovskaya¹, B.I. Gorenstein¹,
A.B. Kuzmich¹, T.N. Pyzhik².*

¹Institute of Biochemistry, 50, Lenin Komsomol Boulevard, Grodno 230017 Belarus,
tel/fax: 152 33 41 21.

²Grodno State Medical University

Pyruvate dehydrogenase, threonine aldolase and phosphoethanolamine lyase can produce acetaldehyde during normal metabolism. We studied the effect of loading with the substrates of these enzymes (pyruvate, 500 mg/kg, i.p., threonine 500 mg/kg, i.p., and phosphoethanolamine, 230 mg/kg, i.p.) on the blood concentrations of endogenous acetaldehyde and ethanol and the activities of enzymes producing and oxidizing acetaldehyde in the liver of normal rats and rats with liver injury provoked by chronic carbon tetrachloride (CCl₄) treatment (0.2 ml i.p. per rat, 2 times a week during 4 weeks). Blood was collected before the treatment and then 30 min and 1 h following the administration of the substrates to intact and CCl₄-treated rats. Endogenous acetaldehyde and ethanol were determined by headspace GC. The CCl₄ treatment resulted in decreased liver alcohol dehydrogenase and aldehyde dehydrogenase activities and a significant elevation of liver endogenous ethanol and a clear tendency to enhance blood acetaldehyde levels. Pyruvate increased blood endogenous acetaldehyde in CCl₄-treated animals and endogenous ethanol - in the control group of animals. Threonine elevated endogenous acetaldehyde in normal rats. Phosphoethanolamine increased endogenous ethanol in the intact and CCl₄ groups. At the same time, in CCl₄-treated rats pyruvate administration increased the liver pyruvate dehydrogenase, threonine decreased threonine aldolase, whereas phosphoethanolamine decreased phosphoethanolamine lyase. Thus, the CCl₄ effect on blood endogenous acetaldehyde and ethanol may be mediated through decreased liver ALDH and ADH activities. Liver injury promotes the accumulation of acetaldehyde, derived from physiological sources, including the degradation of pyruvate and threonine by decreased acetaldehyde oxidation.

Key words: carbon tetrachloride, liver injury, endogenous acetaldehyde, pyruvate, threonine, phosphoethanolamine, ethanol.