

6. *Perumal A. S., Rapport M. M.* Life Sci., v. 22, № 9, p. 803—808, 1978.
7. *Тюленев В. Н., Капралов А. А., Смерчинская Л. С., Белик Я.-В.* Биохимия, т. 48, № 5, с. 827—831, 1983.
8. *Dwyer N., Blobel G. J.* Cell. Biol., v. 70, № 3, p. 581—591, 1976.
9. *Folch J., Lees M., Stanley G. N. S. J.* Biol. Chem., v. 226, № 1, p. 497—509, 1957.
10. *Laemmli U. K.* Nature, v. 227, № 5259, p. 680—685, 1970.
11. *Гусев А. А., Цветков В. С.* Лаб. дело, № 2, с. 43—45, 1961.
12. *Смерчинська Л. С., Белик Я. В., Сироватська Л. П., Бірнлло Т. М.* Укр. біохім. журн., т. 48, № 3, с. 609—614, 1976.
13. *Dyce B. S., Bessman S. P.* Environ. Health, v. 27, № 2, p. 205—207, 1973.
14. *Lowry O. H., Rosenbrough N. J., Farr A. L., Randall R. J.* Biol. Chem., v. 193, № 2, p. 265—275, 1951.
15. *Георгиева Г. П.*—В кн.: Химия и биохимия нуклеиновых кислот, с. 74—120, Л., Медицина, 1968.
16. *Giles K. W., Miles A.* Nature, v. 206, № 4979, p. 93—94, 1965.
17. *Agutter P. S., Kathleen B.* Exp. Cell. Res., v. 124, № 2, p. 453—460, 1979.
18. *Krohne G., Franke W. W., Scheer U.* Exp. Cell. Res., v. 116, № 1, p. 85—102, 1978.
19. *Agutter P. S., Birchall K.* Exp. Cell. Res., v. 124, № 3, p. 754—760, 1979.
20. *Aaronson R. P., Blobel G.* Proc. Nat. Acad. Sci. USA. Biol. Sci., v. 72, № 3, p. 1007—1011, 1975.
21. *Smith Ch. D., Wells W. W. J.* Biol. Chem., v. 258, № 15, p. 9360—9367, 1983.
22. *Steer R. C., Goueli S. A., Wilson M. J., Ahmed K.* Biochem. and Biophys. Res. Commun., v. 92, № 3, p. 919—925, 1980.
23. *Steer R. C., Wilson M. J., Ahmed K.* Biochem. and Biophys. Res. Commun., v. 89, № 4, p. 1082—1087, 1979.
24. *Clawson G. A., Woo Ch., Button J., Smuskler E. A.* Biochemistry, v. 23, № 15, p. 3501—3503, 1984.

Поступила 29. XII 1985

УДК 577.175.82:616—003.725

## ВЛИЯНИЕ ЭТАНОЛА НА ВОССТАНОВЛЕНИЕ ЯНТАРНОГО ПОЛУАЛЬДЕГИДА В НЕКОТОРЫХ СТРУКТУРАХ МОЗГА КРЫС

КАНУНИНЦОВА Н. П.

Институт биохимии АН БССР, Гродно

Изучено влияние этанола на восстановление янтарного полуальдегида (ЯПА), предшественника гамма-оксимасляной кислоты (ГОМК), в некоторых структурах мозга крыс. Показано, что через 30 мин после введения этанола (3,5 г/кг, внутрибрюшинно) активность редуктазы не изменяется при условии насыщения ее коферментом и субстратом. Однако изучение кинетических параметров этой реакции позволило выявить снижение  $K_m$  и для кофермента, и для субстрата в больших полушариях мозга на фоне уменьшения кажущейся максимальной скорости окисления NADPH и в больших полушариях, и в базальных ганглиях. В опытах *in vitro* обнаружено снижение активности редуктазы в больших полушариях, но только в присутствии высоких концентраций этанола (0,1—1,0 M). При этом  $K_m$  для субстрата увели-

гена и в базальных ганглиях, и в больших полушариях, а  $K_m$  для кофермента снижена в больших полушариях. Полученные данные свидетельствуют о сложном комплексном влиянии алкоголя на образование ГОМК, в котором участвуют как прямые, так и опосредованные эффекты этанола.

В механизмах действия этанола на ЦНС существенную роль играют вызываемые им изменения активности нейромедиаторных систем мозга, в частности, ГАМК-ергической системы [1, 2], причем влияние этанола может проявляться на различных звеньях ГАМК-системы. Одной из возможных точек приложения действия алкоголя может быть так называемый «ГАМК-шунт» — путь переаминирования ГАМК в ЯПА с последующим превращением в янтарную кислоту или ГОМК. Ферменты метаболизма ЯПА являются NAD- или NADP-зависимыми, поэтому изменение соотношения окисленных и восстановленных форм этих коферментов, которое наблюдается при алкогольной интоксикации, может приводить к изменениям образования ГОМК.

ГОМК является нормальным метаболитом нервной ткани [3]. Неясно пока, какое физиологическое значение имеет эндогенная ГОМК, однако введение больших количеств этого соединения животным или человеку вызывает развитие бокового положения и сна. В последние годы было установлено существование в мозгу человека и животных специфического фермента образования ГОМК—ЯПА-редуктазы [4—6]. Восстановление ЯПА может осуществляться и другим ферментом, так называемой «неспецифической» ЯПА-редуктазой (альдегидредуктазой I или альдегидредуктазой с высокой  $K_m$ ) [6, 7]. Известно, что эта «неспецифическая» ЯПА-редуктаза, в отличие от специфической, весьма чувствительна к действию барбитуратов, антиконвульсантов, бензодиазепинов [4, 7, 8]. Исходя из того, что у «неспецифической» ЯПА-редуктазы  $K_m$  для ЯПА лишь в 6 раз больше, чем у специфической, можно предположить активное участие этой «неспецифической» редуктазы в поддержании постоянного уровня ГОМК, например, при алкогольной интоксикации, с целью уменьшения ее влияния на функциональную активность ЦНС.

В связи с вышесказанным нам представлялось целесообразным изучить влияние этанола на активность «неспецифической» ЯПА-редуктазы в отдельных структурах головного мозга.

### Материалы и методы

Эксперименты выполнены на белых беспородных крысах-самцах массой 160—200 г. Животным вводили 3,5 г/кг этанола внутривенно за 30 мин до декапитации. В опытах *in vitro* этанол добавляли в среду инкубации за 5 мин до добавления субстрата.

Животных декапитировали, извлекали мозг и выделяли базальные ганглии, большие полушария и ствол мозга [15]. Навески тканей гомогенизировали (1:20, масса/объем) в  $\text{Na}^+$ -фосфатном буфере, 10 мМ, рН 7,0, содержащем 0,5 мМ 2-меркаптоэтанола, и центрифугировали 1 ч при 0—4° 25000g. Полученную надосадочную жидкость использовали в качестве источника фермента [8]. Среда инкубации содержала  $\text{Na}^+$ -фосфатный буфер—100 мМ; 2-меркаптоэтанол—0,5 мМ;

NADPH—0,1 мМ; ЯПА—0,5 мМ и 200 мкл надосадочной жидкости (примерно 0,4 мг белка), рН среды 7,0. Субстратом для реакции служил ЯПА, полученный из диформилсукцината («Calbiochem—Behring Ltd»). Об активности фермента судили по уменьшению поглощения NADPH при 340 мμ. Для определения кинетических параметров в пробы добавляли 100 мкМ NADPH и ЯПА в концентрациях 50—1000 мкМ при определении кажущейся  $K_m$  для субстрата или же 500 мкМ ЯПА и различные концентрации NADPH (5—100 мкМ) при определении кажущейся  $K_m$  для кофермента. Предварительно было установлено, что фермент проявляет свою активность только в присутствии NADPH, но не NADH. Обработку данных проводили методом линейного регрессионного анализа графиков Вульфа-Хофста на ЭВМ [16, 17]. Белок определяли по Lowry и соавт. [18].

### Результаты и обсуждение

Литературные данные о влиянии этанола на образование и метаболизм ГОМК немногочисленны. В работе Gold, Roth [12] не было обнаружено изменений количества  $^3H$ -ГОМК, образовавшейся из  $^3H$ -ГАМК после введения алкоголя. Однако эти авторы не измеряли скорости метаболизма ГОМК. Позднее было показано отсутствие эффектов этанола (200 мМ) на скорость восстановления ЯПА цитозолем, полученным из ткани мозга, с NADH как кофактором [13], однако в последние годы установлено, что наилучшим или даже единственным кофактором при восстановлении ЯПА является NADPH. Anderson и соавт. [14] не обнаружили изменений восстановления ЯПА в присутствии этанола до 200 мМ, они определяли этот показатель в цитозоле, полученном из гомогената, приготовленного на 0,32 М сахарозе с последующим центрифугированием. Возможно, при этом были удалены формы редуктаз, чувствительные к действию нейротропных препаратов.

Введение этанола в наркотической дозе (3,5 г/кг) не вызывает достоверных изменений скорости восстановления ЯПА в присутствии насыщающих концентраций ЯПА и NADPH ни в одном из исследованных отделов мозга крыс (табл. 1). Однако при изучении кинетических

Таблица 1  
Влияние этанола *in vivo* на активность „неспецифической“ ЯПА-редуктазы (имоль/мг белка/мин) (n=6)

| Структуры мозга   | Контроль  | Этанол    |
|-------------------|-----------|-----------|
| Базальные ганглии | 4,32±0,34 | 4,02±0,54 |
| Большие полушария | 5,11±0,47 | 4,61±0,66 |
| Ствол             | 5,29±0,61 | 4,35±0,95 |

параметров этой реакции обнаружено снижение кажущейся  $K_m$  и для субстрата, и для кофермента в больших полушариях мозга, тогда как в базальных ганглиях и стволе эти показатели не изменяются (табл. 2). При этом наблюдается также снижение кажущейся величины  $V$  окисления кофермента в базальных ганглиях и больших по-

Таблица 2

Влияние этанола *in vivo* на кинетические параметры «неспецифической»  
ЯПА-редуктазы в структурах мозга крыс

| Ингредиенты             | Исследуемые показатели         | Базальные ганглии |            | Большие полушария |              | Ствол     |           |
|-------------------------|--------------------------------|-------------------|------------|-------------------|--------------|-----------|-----------|
|                         |                                | контроль          | этанол     | контроль          | этанол       | контроль  | этанол    |
| NADPH<br>(5-100<br>мкМ) | $K_m$<br>(мкМ)                 | 9,5±2,4           | 12,0±0,8   | 27,3±0,5          | 14,2±0,9***  | 19,8±3,0  | 19,9±0,5  |
|                         | $V$<br>(нмоль мг<br>белка/мин) | 4,52±0,36         | 3,31±0,37* | 6,54±0,22         | 3,50±0,39*** | 4,75±0,96 | 3,48±0,13 |
| ЯПА<br>(50-1000<br>мкМ) | $K_m$<br>(мкМ)                 | 210±8             | 2,0±7      | 2,0±12            | 168±8*       | 188±6     | 188±11    |
|                         | $V$<br>(нмоль мг<br>белка/мин) | 5,45±0,34         | 5,88±0,34  | 5,93±0,63         | 6,19±0,53    | 6,56±0,38 | 6,95±0,69 |

Примечание. Здесь и в табл. 3 значения  $K_m$  и  $V$  определяли по Вульффу-Хофсту, используя метод линейного регрессивного анализа. \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ .

лушарных мозга при отсутствии изменений скорости восстановления субстрата.

В условиях *in vitro* в базальных ганглиях присутствие различных концентраций этанола не сопровождается достоверными изменениями скорости восстановления ЯПА. В то же время в больших полушариях восстановление ЯПА замедляется, но только в присутствии высоких (0,1—1,0 М) концентраций алкоголя (рисунок).

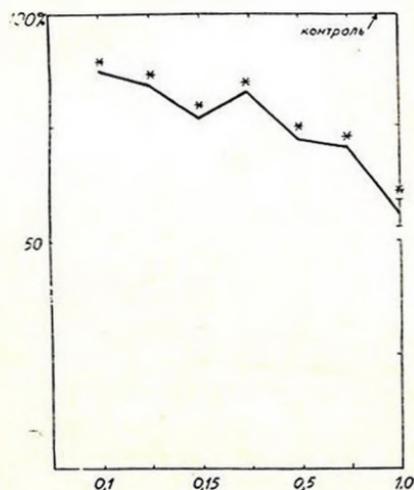


Рис. Влияние этанола *in vitro* на активность «неспецифической» ЯПА-редуктазы (контроль принят за 100%) в больших полушариях мозга крыс. По оси абсцисс — концентрация этанола (М), по оси ординат — активность фермента (%): \* $p < 0,05$

Окисление NADPH в присутствии насыщающей концентрации ЯПА и различных концентраций кофактора показывает отсутствие изменений кажущейся  $K_m$  для кофактора в базальных ганглиях, тогда как в больших полушариях ее значение уменьшается, что, наряду с отсутствием изменений  $V$ , вероятно, свидетельствует об увеличении средства редуктазы к коферменту (табл. 3). Изучение кинетических параметров восстановления ЯПА в присутствии насыщающей концентрации NADPH и различных концентраций субстрата выявляет увеличение кажущейся  $K_m$  в базальных ганглиях и в больших полушариях мозга при отсутствии изменений кажущейся величины  $V$ .

Таким образом, изучение кинетических параметров реакции восстановления ЯПА позволяет более четко выявить эффекты этанола, определить характер этого влияния и возможные механизмы действия. Так, после введения алкоголя в организм не обнаруживается изменений редуктазной активности в мозгу в присутствии насыщающих концентраций субстрата и кофермента. При добавлении этанола в среду инкубации скорость восстановления ЯПА уменьшалась в больших полушариях, но только в случае высоких концентраций спирта.

В то же время кинетические константы изменяются заметным образом под влиянием этанола. Уменьшение кажущейся максимальной скорости окисления NADPH в условиях целостного организма, по-видимому, подтверждает данные об изменении соотношения окисленных

и восстановленных форм NAD и NADP по действию этанола, что является существенным моментом в неспецифических эффектах последнего [19, 20]. И хотя по данным Lopes-Cardozo, Albers [21], изменение этого соотношения не играет существенной роли в регуляции активности ГАМК—ГОМК-шунта на уровне ГАМК-Т, оно может внести нарушения на уровне дегидрогеназы и редуктазы ЯПА. Уменьшение же кажущейся  $K_m$  для кофермента на этом фоне может носить компенсаторный характер. Кажущаяся  $K_m$  для ЯПА на фоне введения алкоголя в организм снижается в больших полушариях, что может быть как следствием индукции редуктазной активности ткани повышенными количествами альдегидов, образующихся в присутствии этанола, так и компенсаторной активацией фермента, направленной на поддержание постоянного уровня ГОМК в мозгу. Добавление же этанола в инкубационную среду приводит, возможно, к конкурентным

Таблица 3

Влияние этанола *in vitro* (250 мМ) на кинетические параметры «неспецифической» ЯПА-редуктазы

| Ингредиенты           | Показатели                | Базальные ганглии |              | Большие полушария |              |
|-----------------------|---------------------------|-------------------|--------------|-------------------|--------------|
|                       |                           | контроль          | этанол       | контроль          | этанол       |
| NADPH<br>(5—100 мкМ)  | $K_m$ (мкМ)               | 14,2±1,0          | 14,7±0,6     | 17,1±1,4          | 11,8±0,4**   |
|                       | V<br>(нмоль/мг белка/мин) | 3,64±0,44         | 3,12±0,25    | 3,09±0,38         | 2,42±0,12    |
| ЯПА (5)—<br>1000 мкМ) | $K_m$ (мкМ)               | 72,0±1,4          | 133,0±5,0*** | 83,0±5,0          | 149,0±5,5*** |
|                       | V<br>(нмоль/мг белка/мин) | 3,14±0,1          | 3,41±0,21    | 2,13±0,2          | 2,62±0,17    |

отношениям между субстратом и этанолом, так как кажущаяся V не изменяется, а кажущаяся  $K_m$  для субстрата увеличивается.

Итак, полученные нами данные свидетельствуют о том, что этанол оказывает определенное воздействие на процессы образования ГОМК, наиболее выраженное в больших полушариях мозга. Воздействие это комплексное и складывается, вероятно, не только из влияния алкоголя на окисление NADPH и конкуренции с ЯПА. В условиях целостного организма в регуляцию этих процессов включаются, по-видимому, нарушения обмена других альдегидов, а также влияния, направленные на поддержание гомеостаза ГОМК. Дальнейшее изучение эффектов этанола на очищенных альдегидредуктазах позволит уточнить характер взаимоотношений между этанолом и ГОМК и их вклад в проявление алкогольной интоксикации на деятельности ЦНС.

# EFFECT OF ETHANOL ON SUCCINIC SEMIALDEHYDE REDUCTION IN RAT BRAIN REGIONS

KANUNNIKOVA N. P.

Institute of Biochemistry, Academy of Sciences of BSSR, Grodno

The influence of ethanol on reduction of succinic semialdehyde (SSA), the precursor of gamma-hydroxybutyric acid (GHBA), in some rat brain regions has been studied. At saturating concentrations of cofactor (NADPH) and substrate (SSA) the reductase activity was not changed in basal ganglia, big hemispheres and brain stem 30 min after the injection of alcohol (3,5 g/kg, i. p.), but the study of the kinetic parameters of this reaction showed a decrease in  $K_m$  for both the substrate and the cofactor in big hemispheres and basal ganglia. In *in vitro* experiments, a decrease in the reductase activity was obtained, but it was detectable only with the large dose of alcohol (0,1–1,0 M); the  $K_m$  for the substrate increased in basal ganglia and hemispheres, but the  $K_m$  for the cofactor decreased in hemispheres. Data obtained show a complex influence of alcohol, involving both direct and indirect effects, on the formation of GHBA in rat brain.

## Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Сутинский Н. А. Биохимические основы действия этанола на центральную нервную систему, М., Медицина, 1980.
2. Hunt W. A. Neurosciences and Biobehav. Rev., v. 7, p. 87–95, 1983.
3. Roth R. H., Giarmar N. G. Biochem. Pharmacol., v. 19, p. 1087–1093, 1970.
4. Cash C. D., Maitre M., Mandel P. J. Neurochem., v. 33, p. 1169–1175, 1979.
5. Rumigny J. F., Maitre M., Cash C. D., Mandel P. FEBS Lett., v. 117, p. 111–116, 1980.
6. Turner A. J., Tipton K. F. Biochem. J., v. 13, p. 765–772, 1972.
7. Cromlish J. A., Flynn F. G. J. Neurochem., v. 44, p. 1485–1493, 1985.
8. Whittle S. R., Turner A. J. Biochim. et biophys. acta, v. 657, p. 94–105, 1981.
9. Kaufman E. E., Nelson Th., Goochee Ch., Sokoloff L. J. Neurochem., v. 32, p. 699–712, 1979.
10. Snead O. C., Liu Chun-Che. Biochem. Pharmacol., v. 33, p. 2587–2590, 1984.
11. Gessa G. L., Vargui L., Crabai F., Boero C., Caboni F., Camba R. Life Sci., v. 5, p. 1921–1930, 1966.
12. Gold B. J., Roth R. H. J. Neurochem., v. 28, p. 1039–1073, 1977.
13. Rivett A. J., Smith J. L., Tipton K. F. Biochem. Pharmacol., v. 30, p. 741–747, 1981.
14. Anderson P. A., Ritzmann R. F., Tabakoff B. J. Neurochem., v. 28, p. 633–639, 1977.
15. Glowinsky J., Iversen L. L. J. Neurochem., v. 13, p. 655–669, 1966.
16. Hofstee F. H. J. Nature, v. 184, p. 1296–1298, 1959.
17. Wilkinson G. N. Biochem. J., v. 80, p. 324–332, 1961.
18. Lowry O. H., Rosebrough N. G., Farr A. L., Randall R. J. J. Biol. Chem., v. 193, p. 265–275, 1951.
19. Lieber C. S. Sci. Amer., v. 234, p. 25–33, 1976.
20. Островский Ю. М., Садовник М. И.—В кн.: Итоги науки и техники. Токсикология, т. 13, с. 93–150, М., ВИННИТИ, 1984.
21. Lopes-Cardozo M., Albers R. W. J. Neurochem., v. 33, p. 1259–1265, 1979.

Поступила 31. X 1985