

УДК 612.822:547.262:577.15

ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ АЛЬДЕГИДДЕГИДРОГЕНАЗЫ МОЗГА ГАЗОХРОМАТОГРАФИЧЕСКИМ МЕТОДОМ

С.П. Пронько, С.М. Зиматкин

УО «Гродненский государственный медицинский университет»

С помощью газохроматографического метода по убыли ацетальдегида определена активность альдегиддегидрогеназы (АльДГ) с низкой-Км в гомогенатах и субклеточных фракциях мозга крыс. Использование ингибитора АльДГ цитрала показало, что окисление ацетальдегида происходит при участии АльДГ. Определение активности АльДГ по убыли ацетальдегида более специфично, чем традиционная оценка активности фермента по образованию НАД·Н, и позволяет исключить активность других ферментных систем, нарабатывающих НАД·Н.

Ключевые слова: АльДГ, ацетальдегид, субклеточные фракции, мозг

Aldehyde dehydrogenase (ALDH) activity in brain subcellular fractions was determined by measuring of acetaldehyde disappearance by gas chromatography. Use of ALDH inhibitor citral support that acetaldehyde oxidation by brain tissue is provided by ALDH. Determination of ALDH activity defined by measuring of acetaldehyde disappearance is more specific then traditional estimation based on NAD·H accumulation and allow to exclude the activity of other NAD·H generating systems, proposed method is also more sensitive and reproducible.

Key words: ALDH, acetaldehyde, subcellular fractions, brain

При острой интоксикации этанолом изменение функций центральной нервной системы и различных органов человека является следствием воздействия на организм как самого этанола, так и его первого метаболита – ацетальдегида, который способен играть важную роль в опосредовании метаболических, токсических и фармакологических эффектов этанола [7]. В частности, происходит уменьшение соотношения НАД⁺/НАДЧН в результате окисления этанола и ацетальдегида, что сдвигает метаболизм альдегидных продуктов обмена нейромедиаторов с окислительного на редуктазный путь [2]. Этому же способствует и накопление ацетальдегида, который конкурирует с альдегидными продуктами обмена нейромедиаторов в альдегиддегидрогеназной реакции.

Альдегиддегидрогеназа (КФ 1.2.1.3; АльДГ) является основным ферментом, окисляющим ацетальдегид в мозге. АльДГ, находящаяся в барьерных структурах мозга, препятствует проникновению образовавшегося на периферии ацетальдегида из крови в мозг [17]. АльДГ мозга быстро окисляет ацетальдегид, образующийся в процессе метаболизма этанола в нервной ткани [1,11,15,20]. Поэтому эффекты этанола (ацетальдегида) в мозге в значительной степени должны зависеть от активности этого фермента. И действительно, в многочисленных исследованиях показана взаимосвязь между активностью АльДГ в мозге и влечением к этанолу [5,13], поведенческой устойчи-

востью животных к его действию [19]. Последние исследования всё убедительнее показывают, что от активности АльДГ мозга зависят эффекты этанола на локомоторную активность и поведение животных, возможно, благодаря способности регулировать уровень ацетальдегида в мозге [3,4]. Отмечена прямая связь активности АльДГ с устойчивостью морфологических образований мозга к алкоголю. Так, структуры, особо чувствительные к этанолу (филогенетически более молодые структуры, промежуточные нейроны и др.), отличаются изначально низкой активностью этих ферментов [18]. Ингибиторы АльДГ (дисульфидрам, цианамид) используются при лечении алкоголизма в качестве средств, вызывающих отвращение к алкоголю. Доказано значение накопления ацетальдегида в крови после приема алкоголя на фоне действия этих препаратов для развития аверсивной реакции. Однако центральные механизмы снижения потребления алкоголя после приема ингибиторов АльДГ изучены недостаточно.

Для исследования активности АльДГ в мозге широко используются спектрофотометрические методы, основанные на определении наработки НАД·Н при окислении альдегидных субстратов [12,17]. Однако эти методы недостаточно воспроизводимы, чувствительны и специфичны. Поэтому целью настоящей работы явилось определение активности АльДГ мозга с помощью газохроматографического метода по убыли субстрата – ацетальдегида.

Материалы и методы исследования

Выделение субклеточных фракций. В экспериментах использовали беспородных крыс-самцов массой 230-280 г. Перед выделением субклеточных фракций проводили перфузию мозга, для этого под тиопенталовым наркозом животным внутрисердечно вводили 300-400 мл охлаждённого до 4°C изотонического раствора хлорида натрия, содержащего 1000 ед. гепарина на литр. Образцы мозга взвешивали и гомогенизировали в гомогенизаторе со стеклянной ступкой и тefлоновым пестиком. 10 % гомогенат готовили на охлажденной до 0-4°C среде для гомогенизации, содержащей 0,32 М сахарозу, 1 мМ ЭДТА и 1 мМ Трис-HCL. Для удаления обрывков клеток гомогенат центрифугировали при 2000 об/мин 2 минуты. Затем надосадочную жидкость центрифугировали при 5000 об/мин в течение 7 минут. Надосадочную жидкость аккуратно отделяли от осадка, содержащего ядра, и центрифугировали при 10 тыс об/мин в течение 10 минут. Осадок, содержащий митохондрии, ресуспендировали сахарозной средой и центрифугировали ещё раз при 10 тыс об/мин в течение 10 минут. Надосадочную жидкость, полученную при втором центрифугировании, центрифугировали в течение 20 минут при 12 тыс об/мин для получения I-фракции, содержащей лёгкие митохондрии и пероксисомы. Полученная надосадочная жидкость содержала микросомы и цитозоль. Цитозольная фракция отделялась от микросомальной центрифугированием при 105 000 g 60 мин.

Определение активности АльДГ в гомогенатах и субклеточных фракциях. Животных забивали без наркоза путём декапитации. Мозг быстро извлекали, промывали в физрастворе и помещали на фильтровальную бумагу на лёд. Образцы мозга взвешивали и гомогенизировали в гомогенизаторе со стеклянной ступкой и тefлоновым пестиком. 10 % гомогенат готовили на льдуном 0,1 М калий-фосфатном буфере (pH 7,4), содержащем 0,1 % Triton X100. Для удаления обрывков клеток гомогенат центрифугировали в течение 1 минуты при 3000 об/мин. Инкубационная среда содержала 50 мМ натрий-пирофосфатный буфер (pH 8,8) и 1 мМ НАД. После добавления в инкубационную среду 0,2 мл 10% гомогената или 0,2 мл ресуспендированной субклеточной фракции, пробы преинкубировали в течение 10 минут при 37°C. Затем во флаконы с пробамии с помощью шприца с иглой вносили раствор ацетальдегида в конечной кон-

центрации 50 мкМ и инкубировали в течение различных интервалов времени при 37°C. Реакцию останавливали добавлением депротеинизирующего раствора, содержащего 3 М хлорную кислоту и 1 мМ 1-пропанол, используемый как внутренний стандарт. Затем пробы инкубировали 15 мин при 65°C и 1 мл парогазовой фазы вводили в газовый хроматограф HP 6890 с детектором ионизации в пламени и колонкой (длина 2,5 м, внутренний диаметр 2 мм), наполненной хроматоном N-AW-DMCS, пропитанным 5% Carbowax 20M. Температура инжектора была 180°C, печи – 70°C, детектора – 220°C. Время удерживания: ацетальдегид – 0,48 мин, пропанол – 1,42 мин.

Белок определяли по методу Лоури [9].

Статистическую обработку полученных данных проводили на персональном компьютере с помощью программы «Statistica» (версия 5.0). Оценку достоверности изменений проводили с применением параметрического t-критерия Стьюдента.

Результаты и обсуждение

Исследование активности АльДГ по убыли ацетальдегида (рис. 1) при инкубации гомогената в присутствии кофактора НАД⁺ показало, что на протяжении 15 минут реакция шла линейно (коэффициент корреляции r составил 0,99; $P < 0,01$). В более поздние сроки наблюдения (до 60 мин) линейность нарушалась, снижался и коэффициент корреляции (0,89; $P < 0,05$). Следовательно, для определения активности АльДГ по убыли ацетальдегида оптимальный срок инкубации составляет 10-15 минут.

На рис. 2 показана зависимость активности АльДГ от количества ткани (10, 20 и 30 мг сырой ткани) в пробе. Показано, что с увеличением ко-

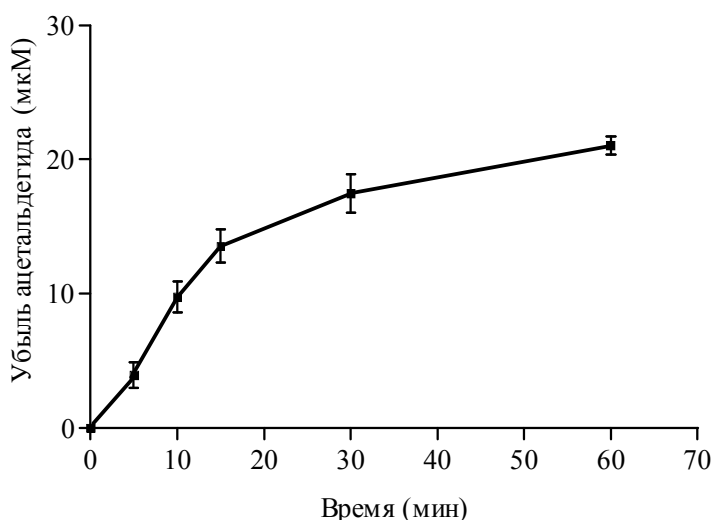


Рис. 1. Убыль ацетальдегида (50 мкМ исходная концентрация в пробах) в гомогенатах мозга в зависимости от времени инкубации при 37°C

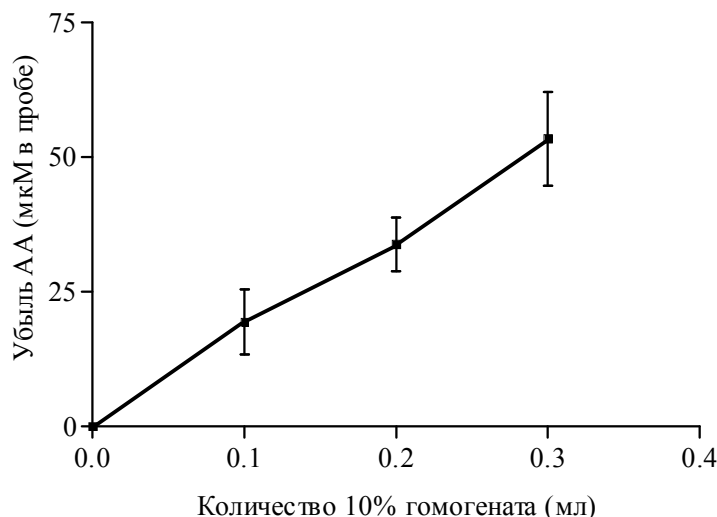


Рис. 2. Убыль ацетальдегида (АА) в зависимости от количества гомогенатах мозга в пробе. Исходная концентрация ацетальдегида 50 мкМ, инкубация 15 минут при 37°C.

личества ткани в пробе происходит линейное увеличение активности АльДГ (убыли ацетальдегида), коэффициент корреляции $r = 0,99$; $P < 0,01$. Это позволяет, при необходимости, использовать небольшое количество ткани для анализа.

Активность АльДГ в опытных пробах составила $14,3 \pm 0,52$ нмоль/мг белка/15 мин, что соответствует литературным данным. Убыль ацетальдегида без кофактора НАД⁺ была достоверно ниже ($1,05 \pm 0,34$; $P < 0,0001$), чем в присутствии НАД⁺, что указывает на то, что окисление ацетальдегида происходит при участии АльДГ, активность которой зависит от присутствия кофактора. При инкубации гомогената, подвергнутого термической обработке (10 минут при 100°), убыль ацетальдегида практически не наблюдалась. Это свидетельствует о том, что наблюдаемое нами окисление ацетальдегида является ферментативным процессом и катализируется НАД⁺-зависимой АльДГ.

Для дальнейшего изучения способности мозга окислять ацетальдегид (активности АльДГ) выбраны следующие условия: инкубировали 0,2 мл 10% гомогената мозга в течение 10-15 мин при 37°C в присутствии 1 мМ НАД⁺ и 50 мкМ ацетальдегида (конечная концентрация). Использование ацетальдегида в концентрации 50 мкМ позволяет определить активность АльДГ с низкой Км (класс II), и, хотя ее активность в мозге меньше активности АльДГ с высокой

Км [10], обнаружение низких уровней ацетальдегида в мозге при алкогольной интоксикации дает основание считать, что именно АльДГ с низкой-Км является основной формой, окисляющей ацетальдегид во время алкогольной интоксикации.

Определение активности АльДГ в субклеточных фракциях мозга крысы показало, что наиболее высокий уровень активности приходится на митохондриальную фракцию, где он был достоверно выше ($P < 0,0001$) уровня активности этого фермента в целом гомогенате мозга (рис. 3). Это, вероятно, связано с присутствием АльДГ класса II, локализуемой в митохондриальном матриксе и относящейся к изоферментам с большим сродством к ацетальдегиду (Км=3

мкМ), поэтому считается, что это основной класс, ответственный за окисление ацетальдегида [14]. Наименьший уровень активности фермента наблюдался во фракции микросом и цитозоля, а также во фракции, содержащей ядра. Эти уровни были достоверно ниже ($P < 0,0001$) по сравнению с гомогенатом мозга. Во фракции, обогащенной пероксисомами, активность АльДГ достоверно не отличалась от активности наблюдаемой в гомогенате, и была лишь на 30% ниже, это может быть связано с присутствием во фракции примеси легких ми-

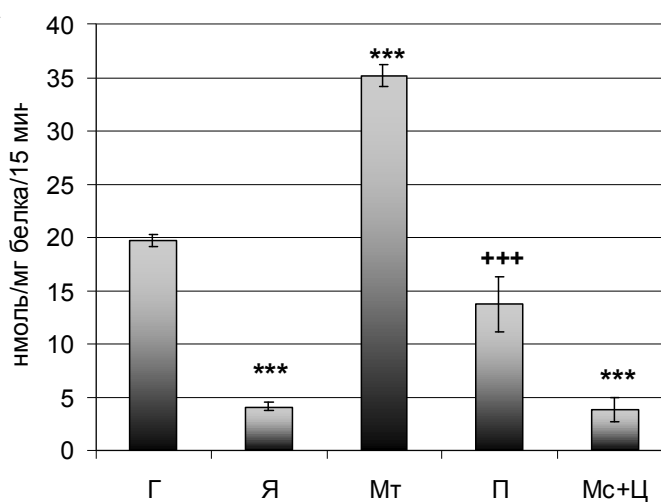


Рис. 3. Распределение альдегидокисляющей способности мозга по субклеточным фракциям (Г-гомогенат, Я-ядра, Мт-митохондрии, П-пероксисомы, Мс+Ц-микросомы и цитозоль). Исходная концентрация ацетальдегида 50 мкМ, инкубация 15 минут при 37°C.

Примечание: *** - $P < 0,0001$, по сравнению с гомогенатом

+++ - $P < 0,0001$, по сравнению с митохондриальной фракцией

тохондрий. Однако активность в этой фракции была достоверно ниже ($P < 0,0001$) уровня, наблюдаемого в митохондриальной фракции.

Активность АльДГ, определенная по убыли ацетальдегида в гомогенате мозга, составила $33,8 \pm 4,97$ нмоль/мг белка/15 мин и была сопоставима с данными, полученными спектрофотометрически по наработке НАД·Н [10,6,16]. Однако определение активности АльДГ по убыли ацетальдегида более специфично и позволяет исключить активность других ферментных систем, нарабатывающих НАД·Н. Кроме того, предложенный метод отличается хорошей воспроизводимостью, простотой и чувствительностью, а также, в отличие от спектрофотометрического метода определения, где важным фактором является пропускная способность инкубационной смеси, не требует большого разведения гомогената, что повышает точность исследования.

Выводы

1. Определение активности АльДГ в ткани мозга с помощью газохроматографического метода по убыли ацетальдегида дает сравнимые результаты со спектрофотометрическим методом, основанным на измерении образовавшегося НАД·Н, но является более чувствительным.

2. Наибольшая активность фермента обнаружена в митохондриях мозга, где находится АльДГ с низкой- K_m (АльДГ II), наименьшая – в ядрах, микросомах и цитозоле.

Литература

1. Пронько С.П.. Ингибиторный анализ вклада отдельных ферментов в окисление этанола в мозге акаталазных мышей. Материалы международной научно-практической конференции молодых учёных и студентов. Успехи современной биологии. Гродно: ГГМУ, 2002, С.99-101.
2. Сытинский И.А. Биохимические основы действия этанола на центральную нервную систему // Москва «Медицина». – 1980. – С.32-36.
3. Escarabajal D., Aragon C.M.G. Concurrent administration of diethyldithiocarbamate and 4-methylpyrazole enhances ethanol-induced locomotor activity: the role of brain ALDH // Psychopharmacology. – 2002. – Vol.160. – P.339-343.
4. Escarabajal D., Aragon C.M.G. The effect of cyanamide and 4-methylpyrazole on the ethanol-induced locomotor activity in mice // Pharmacological Biochemistry and Behavior. – 2002. – Vol.72. – P.389-395.
5. Gill K., Amit Z., Smith B.R. The regulation of alcohol consumption in rats: the role of alcohol-metabolising enzymes-catalase and aldehyde dehydrogenase // Alcoholism. – 1996. – Vol.13. – P.347-353.
6. Hassinen I.E., Harkonen M.H.A., Ylikahri R.H. Metabolic effects of acetaldehyde in the intact rat brain cortex and its subcellular fractions // Brain Research. – 1974. – Vol.70. – P.301-312.
7. Hunt W. A. Role of acetaldehyde in the actions of ethanol in the

- brain – a review // Alcohol. – 1996. – Vol. 13. – P. 147-151.
8. Koivulo T., Turner A.J., Huttunen M., Koivusalo M. Subcellular and perisynaptic distribution of rat brain aldehyde dehydrogenase activity // J Neurochemistry. – 1981. – Vol.36. – P.1893-1897
9. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Fair A. L., and Randall R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent // J. Biol. Clu-m. – 1951. – Vol.193. – P.265-275.
10. Pettersson H., Tottmar O. Aldehyde dehydrogenase in rat brain. Subcellular distribution and properties // J Neurochemistry. – 1982. – Vol.38. – P.477-487.
11. Pronko S.P., Zimatkin S.M., Pronko P.S. Contribution of catalase and cytochrome P450 2E1 to ethanol oxidation in the brain of mice with genetic deficiency of these enzymes ESBRA 2003, Abstracts, Alcohol and Alcoholism 2003, P.503
12. Shiohara E., Tsukada M., Chiba S., Yamazaki H., Nishiguchi K., Miyamoto R., Nakanishi S. Subcellular aldehyde dehydrogenase activity and acetaldehyde oxidation by isolated intact mitochondria of rat brain and liver after acetaldehyde treatment // Toxicology. – 1984. – Vol.30. – P.25-30.
13. Socaransky S.M., Aragon C.M., Amit Z. Brain ALDH as possible modulator of voluntary ethanol intake // Alcoholism. – 1985. – Vol.2. – P.361-365.
14. Riveros-Rosas H., Julian-Sanchez A., Pina E. Enzymology of ethanol and acetaldehyde metabolism in mammals // Archives of Medical Research. – 1997. – Vol.28. – P.453-471.
15. Weiner H. Aldehyde dehydrogenase. Mechanism of action and possible physiological role, in Biochemical Pharmacology of Eihanol, (Majchrowicz E. and Noble E. P., eds), Plenum, New York. – 1979. – Vol.1. – P.107-123.
16. Weiner H., Ardel B. // J Neurochemistry. – 1984. – Vol.42. – P.109.
17. Westcott Y., Weiner H., Shullz J., and Myers R. D. In vivo acetaldehyde in the brain of the rat treated with ethanol // Biochemical Pharmacology. – 1980. – Vol.29. – P.411-417.
18. Zimatkin S.M. Histochemical study of aldehyde dehydrogenase in the rat CNS // Journal of Neuro-chemistry. – 1991. – Vol.56. – P.1-11.
19. Zimatkin S.M., Deitrich R. Aldehyde dehydrogenase activities in the brains of rats and mice genetically selected for different sensitivity to alcohol // Alcoholism: Clinical and Experimental Research. – 1995. – Vol.19. – P.1300-1306
20. Zimatkin S.M., Liopo A., Deitrich R. 1988

Resume

USE OF GAS CHROMATOGRAPHY FOR DETERMINATION OF ALDEHYDE DEHYDROGENASE ACTIVITY IN BRAIN TISSUE

Pronko S.P., Zimatkin S.M.
Grodno State Medical University

Determination of aldehyde dehydrogenase activity in brain tissue by measuring acetaldehyde disappearance was used for determination of aldehyde dehydrogenase activity in brain subcellular fractions. Determination of ALDH activity defined by measuring of acetaldehyde disappearance is more specific then traditional estimation based on NAD·H accumulation and allow to exclude the activity of other NAD·H generating systems, proposed method is also more sensitive and reproducible.