ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ
(12)

РЕСПУБЛИКА БЕЛАРУСЬ

(19) **BY** (11) **5490**
(13) **C1**
(51)[7] **G 01N 33/48**

НАЦИОНАЛЬНЫЙ ЦЕНТР ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(54) СПОСОБ ОПРЕДЕЛЕНИЯ МЕТАБОЛИЗМА ЭТАНОЛА В ГОЛОВНОМ МОЗГЕ ЖИВОТНЫХ

(21) Номер заявки: a 19990772
(22) 1999.08.05
(46) 2003.09.30
(71) Заявители: Государственное высшее учебное учреждение "Гродненский государственный медицинский университет"; Институт биохимии НАН Беларуси (BY)

(72) Авторы: Лиопо Антон Валерьевич; Зиматкин Сергей Михайлович; Захаров Олег Юрьевич (BY)
(73) Патентообладатели: Государственное высшее учебное учреждение "Гродненский государственный медицинский университет"; Институт биохимии НАН Беларуси (BY)

(57)

Способ определения метаболизма этанола в головном мозге животных, включающий перфузию мозга, гомогенизацию его образца, преинкубацию, добавление этанола и газохроматографическое исследование, **отличающийся** тем, что после добавления этанола пробу разделяют на две равные части, в одну из которых добавляют депротеинизирующий раствор сразу, а в другую - после окончания инкубации, после чего определяют разницу между уровнем этанола в этих частях, по которой судят о количестве метаболизированного этанола.

(56)

Zimatkin S.M., Liopo A.V. et all, Alcoholism: Clinical and Experimental Research, 1998. Vol. 22. - N8. - P.1623-1627.

RU 2063035 C1, 1996.

Изобретение относится к области биохимии, а именно к аналитической биохимии, и может использоваться для оценки интенсивности метаболизма этанола в головном мозге.

Наиболее близким к заявляемому является способ исследования метаболизма этанола в гомогенатах головного мозга крыс по накоплению в них продукта метаболизма этанола ацетальдегида (Zimatkin S.M., Liopo A.V., Deitrich R.A. Distribution and kinetics of ethanol methabolism in rat brain. Alcoholism: Clinical and Experimental Research, 1998. Vol.22. - No.8. - P. 1623-1627). Способ включает перфузию мозга, гомогенизацию его образцов, преинкубацию в течение 10 мин, инкубацию в присутствии этанола и газохроматографическое определение накапливающегося в ткани ацетальдегида.

Недостатками этого способа являются: 1) метаболизм этанола оценивается косвенно, по накоплению в ткани его первого метаболита - ацетальдегида; 2) метаболизм этанола оценивается приблизительно, поскольку большая часть образующегося в процессе метаболизма этанола ацетальдегида быстро окисляется в ткани мозга до ацетата, а также свя-

BY 5490 C1

Репозиторий ГГМУ

зывается белками, фосфолипидами, биогенными аминами и другими химическими компонентами мозга.

Задача изобретения - повышение точности определения этанолметаболизирующей способности ткани головного мозга.

Поставленная задача решается путем определения разницы между уровнем этанола в гомогенате мозга, где метаболизм этанола подавлен химическим путем, и уровнем этанола в другой половине того же гомогената, которая инкубируется без подавления метаболизма этанола.

Способ осуществляют следующим образом. Животных (беспородных белых крыс-самцов гетерогенной популяции, массой 180-220 г) под эфирным наркозом перфузируют через сердце 300-400 мл охлажденного изотонического раствора NaCl с гепарином (1000 ед/л). Затем мозг быстро извлекают, промывают в этом же растворе и замораживают в жидком азоте. Образцы мозга взвешивают и 10 % гомогенаты готовят на холоду в стеклянном стакане с тефлоновым пестиком, используя охлажденный 0,1 М калий фосфатный буфер (pH = 7,4), содержащий).! % Тритон X-100. Гомогенаты хранят при 4 °С и исследуют в тот же день. 1 мл гомогената помещают в герметичные стеклянные флаконы объемом 15 мл и преинкубируют 20 мин в присутствии 10 мМ глюкозы. После преинкубации, не нарушая герметичности, в пробу добавляют 1-50 мМ этанол и разделяют пробу на две равные части - в одну часть добавляют депротеинизирующий раствор (контрольная проба), а другую часть продолжают инкубировать как опытную пробу в течение 30 мин при 37 °С, после чего реакцию останавливают. Реакцию останавливают добавлением депротеинизирующего раствора, содержащего 1,6 М $HClO_4$, 0,4 % ЭДТА, 13 мМ тиомочевины и 3 мМ семикарбазида с 1 мМ 1-пропанолом, используемым в качестве внутреннего стандарта. Затем пробы выдерживают на холоду (4 °С) в течение 60 мин, после чего инкубируют при температуре 65 °С в течение 20 мин. Затем 2 мл парогазовой фазы вводят в газовый хроматограф. Для определения количества метаболизированного тканью мозга этанола высчитывают разницу между уровнем этанола в опытной и контрольной пробах. Содержание белка в гомогенатах определяют по общепринятому методу Lowry et. al. (1951), используя сывороточный альбумин быка как стандарт. Единица измерения количества метаболизируемого этанола: наномоль этанола/мг белка/ч.

Для иллюстрации полученных результатов приведены данные по метаболизму этанола в мозге крысы при различных исходных концентрациях этанола в пробе (таблица).

Преимущества предлагаемого способа по сравнению с прототипом:

способ позволяет прямо, по убыли этанола в образце, оценивать интенсивность его метаболизма в ткани мозга;

разделение каждой пробы после добавления этанола на две равные части позволяет повысить точность способа и учесть возможное неферментативное исчезновение этанола из образца.

Способ прост в осуществлении, достаточно надежен и хорошо воспроизводим. Может быть использован в любой биохимической лаборатории, оснащенной газовым хроматографом.

Репозиторий ГрГМУ

Показатели метаболизма этанола в гомогенатах мозга при инкубации проб в течение 30 мин при различных исходных концентрациях этанола в пробе

Исходная концентрация этанола в пробе, мМ	Метаболизм этанола, микромоль/образец	Метаболизм этанола, наномоль/мг белка/30 мин
1	70	17
	43	10
	33	8
	53	13
	59	14
2	111	27
	52	12
	97	23
	123	30
	118	28
3	143	35
	65	15
	155	37
	164	40
	164	39
5	197	48
	211	49
	193	46
	226	55
	227	54
10	205	50
	232	54
	319	76
	242	59
	241	55
50	496	121
	744	173
	672	160
	373	91
	567	135

Репозиторий ГрГМУ