

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(12)

РЕСПУБЛИКА БЕЛАРУСЬ



НАЦИОНАЛЬНЫЙ ЦЕНТР
ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ
СОБСТВЕННОСТИ

(19) ВУ (11) 8774

(13) С1

(46) 2006.12.30

(51)⁷ G 01N 33/48

(54) СПОСОБ ОПРЕДЕЛЕНИЯ АКТИВНОСТИ МЕТАБОЛИЗМА ЭТАНОЛА В ГОМОГЕНАТЕ ГОЛОВНОГО МОЗГА ЖИВОТНОГО

(21) Номер заявки: а 20030297

(22) 2003.04.07

(43) 2004.12.30

(71) Заявители: Учреждение образования "Гродненский государственный медицинский университет"; Государственное научное учреждение "Институт биохимии Национальной академии наук Беларуси" (ВУ)

(72) Авторы: Пронько Сергей Павлович; Зиматкин Сергей Михайлович; Пронько Павел Сергеевич (ВУ)

(73) Патентообладатели: Учреждение образования "Гродненский государственный медицинский университет"; Государственное научное учреждение "Институт биохимии Национальной академии наук Беларуси" (ВУ)

(56) ZIMATKIN S.M. et al. Alcoholism: Clinical and Experimental Research, 1998, v.22, No.8. - P. 1623-1627.

ВУ а19990772, 2001.

Зиматкин С.М. Актуальные вопросы современной медицины: Материалы юбилейной научной конференции, посвященной 80-летию БГМУ. - Минск, 2001, ч.1. - С. 141-143.

Зиматкин С.М. X съезд Белорусского общества физиологов: Тезисы докладов. - Минск, 2001. - С. 61-62.

GILL K. et al. Alcoholism: Clinical and Experimental Research, 1992, v.16, No.5. - P. 910-915.

(57)

Способ определения активности метаболизма этанола в гомогенате головного мозга животного, включающий преинкубацию проб гомогената мозга в среде, содержащей 0,1 М калий-фосфатный буфер pH 7,4 и 10 мМ глюкозу, внесение этанола, остановку реакции, причем реакцию в контрольной пробе останавливают сразу, а в опытной - после инкубации с этанолом, газохроматографическое определение содержания ацетальдегида в пробах и определение активности метаболизма этанола по разнице в содержании ацетальдегида в опытной и контрольной пробах, **отличающийся** тем, что в среду преинкубации добавляют ингибитор альдегиддегидрогеназы цитраль до конечной концентрации 500 мкМ.

Изобретение относится к области биохимии, а именно к аналитической биохимии, и может использоваться для оценки интенсивности окисления 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 metabolism in rat brain. Alcoholism: Clinical and Experimental Research, 1998, Vol.22, No.8, pp. 1623-1627). Способ включает перфузию мозга, гомогенизацию его образцов, преинкубацию в течение 10 минут, инкубацию в присутствии этанола и газохроматографическое определение накапливающегося в ткани ацетальдегида.

Недостатки у этого способа следующие: метаболизм этанола оценивается не полностью, поскольку часть образующегося в процессе окисления этанола ацетальдегида быстро окисляется в ткани мозга альдегиддегидрогеназой до ацетата; прямое определение убыли этанола также затруднено вследствие малой скорости окисления этанола, когда убыль этанола составляет от 1,14 до 5,16 % от использованной концентрации, что может превышать ошибку измерения.

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

Поставленная задача решается путем перфузии мозга, гомогенизации его образцов, преинкубации и инкубации в присутствии этанола, при этом после добавления этанола в контрольной пробе реакцию останавливают сразу же, а в опытной - после инкубации. Затем проводят газохроматографическое исследование проб, после чего определяют разницу между уровнем ацетальдегида в этих пробах, которая и показывает уровень накопления ацетальдегида из этанола. Отличительным моментом является то, что в среду преинкубации добавляют ингибитор альдегиддегидрогеназы цитраль в конечной концентрации 500 мкМ.

Способ осуществляют следующим образом.

Под тиопенталовым наркозом внутрисердечно животным (беспородным белым крысам-самцам гетерогенной популяции, массой 180-220 г) вводят 300-400 мл охлажденного до 4 °С изотонического раствора хлорида натрия, содержащего 1000 ед. гепарина на литр. Мозг быстро извлекают, промывают в физиологическом растворе и помещают в жидкий азот для хранения. Образцы мозга взвешивают и гомогенизируют в гомогенизаторе со стеклянной ступкой и тефлоновым пестиком. 10 %-ный гомогенат готовят на ледяном 0,1 М калий-фосфатном буфере (pH 7,4), содержащем 0,1 % Triton X100. В 2 флакона объемом 15 мл, содержащих 0,3 мл 0,1 М калий-фосфатного буфера (pH 7,4) с 10 мМ глюкозой и 0,05 мл цитраля в конечной концентрации 500 мкМ, вносят по 0,25 мл 10 %-ного гомогената мозга (контрольная и опытная пробы) и преинкубируют в течение 20 мин при 37 °С. Затем в пробы вносят 0,1 мл этанола (50 мМ конечная концентрация). В контрольных пробах реакцию останавливают сразу после добавления этанола. Опытные пробы инкубируют 30 мин при 37 °С, после чего реакцию останавливают. Реакцию останавливают добавлением депротеинизирующего раствора, содержащего 0,25 мл 3 М хлорной кислоты с 1 мМ 1-пропанолом, используемым в качестве внутреннего стандарта. Перед депротеинизацией в пробы для снижения артефактного образования ацетальдегида вносят 0,05 мл дезферриоксамина (5 мМ конечная концентрация) (Gill K., Menez J.F., Lucas D., Deitrich R.A. *Enzymatic production of acetaldehyde from ethanol in rat brain tissue // Alcoholism: Clinical and Experimental Research*. 1992. Vol. 16. P. 910-915).

Перед определением концентрации ацетальдегида пробы инкубируют 15 мин при 65 °С и 1 мл парогазовой фазы вводят в газовый хроматограф HP 6890 с ПИД и колонкой (2,5 м длиной, с внутренним диаметром 2 мм, наполненной хроматоном N-AW-DMCS, пропитанным carbox 5 % 20 М), температура инжектора 170 °С, печи 70 °С, детектора 220 °С. Определяют содержание ацетальдегида в опытных пробах и контрольных. Определяют разницу между полученными показателями, которая и показывает уровень накопления ацетальдегида из этанола. Содержание белка в гомогенатах определяют по методу Lowry et al. (1951), используя сывороточный альбумин быка как стандарт. Единица измерения количества наработанного из этанола ацетальдегида: наномоль ацетальдегида/мг белка/час.

Инкубацию проб проводят при 37 °С, поскольку эта температура является оптимальной для протекания биохимических реакций. При концентрации цитраля 500 мкМ активность альдегиддегидрогеназы была равна активности альдегиддегидрогеназы в гомогенате мозга после термической обработки (10 минут при 100 °С), что говорит о полном подавлении активности фермента.

BY 8774 C1 2006.12.30

В таблице приведены данные по наработке ацетальдегида из этанола гомогенатами мозга крыс при различных концентрациях цитраля в пробе, иллюстрирующие полученные результаты.

Преимущества предлагаемого способа по сравнению с прототипом:

способ позволяет исключить ферментативное окисление ацетальдегида в пробе и оценить максимальную скорость окисления этанола в мозге;

способ позволяет повысить чувствительность метода и использовать меньшее количество гомогената, что позволит исследовать метаболизм этанола в отдельных регионах и субклеточных фракциях мозга;

повышение уровня ацетальдегида позволяет повысить точность метода.

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

Наработка ацетальдегида гомогенатами мозга из этанола (50 мМ конечная концентрация) после инкубации с различными концентрациями цитраля. Инкубация 30 мин при 37 °С

№	Контроль	Цитраль 1 10 мкМ	Цитраль 2 50 мкМ	Цитраль 3 100 мкМ	Цитраль 4 500 мкМ
1	2,42	1,47	12,78	17,2	8
2	6,42	8,1	0,22	7,2	23,58
3	0	1,15	8,08	6,4	30
4	8,05	16,38	11,77	18	14,5
5	4,88	1,6	20,17	13,73	31,79
6	5,2	14,5	12,1	17,4	25
	4,5±1,176	7,2±2,824	10,85±2,669	13,32±2,153*	22,15±3,757**

* - достоверно ($p < 0,05$) относительно контрольной группы;

** - достоверно ($p < 0,01$) относительно контрольной группы.