НЕЙРОХИМИЯ

т. 3, № 2, 1984

УДК 577.15.081+577.158.344

ДОКАЗАТЕЛЬСТВА НАЛИЧИЯ АЛКОГОЛЬДЕГИДРОГЕНАЗЫ В ГОЛОВНОМ МОЗГУ КРЫСЫ И БЫКА

ЧЕРНИКЕВИЧ Н. Н., ЛОМЕКО И. Е., ВОСКОБОЕВ А. И., ОСТРОВСКИЙ Ю. М.

Отдел регуляции обмена веществ АН БССР, Гродно

Установлено наличие алкогольдегидрогеназы (КФ 1.1.1.1.) в ткани мозга крысы и быка и отсутствие ее в крови и сосудах мозга. Из обоих объектов исследования выделен очищенный в 21 раз препарат фермента с суммарным выходом 36%. Исследована зависимость скорости реакции от pH среды, содержания белка в пробе, времени инкубации и концентрации конкурентного ингибитора—пиразола. Фермент локализован во всех отделах мозга, однако наибольшая активность выявлена в больших полушариях переднего мозга и мозжечка. Установлено наличие множественных форм алкогольдегидрогеназы. Полученные данные свидетельствуют о возможности окисления этанола в ткани мозга при участии алкогольдегидрогеназы.

Изучение обмена этанола в организме сводится, в основном, к выяснению роли печени в его утилизации [1, 2]. Вопрос о путях окисления этанола нервной тканью остается открытым, хотя нервные клетки наиболее чувствительны к его токсическому действию, о чем свидетельствует ряд клинических синдромов, играющих ведущую роль в картине алкоголизма в целом [3]. В опытах по изучению превращения ^{14}C-этанола срезами мозга не обнаружено включения радиоактивной метки в аминокислоты [4] и липиды [5] ткани мозга и образования меченой углекислоты [6, 7]. Аналогичные результаты получены и в случае перфузии изолированного мозга [8]. По данным Rix [9], обмен ^{14}C-этанола происходит лишь в печени животных с последующим включением метки в продукты его окисления, которые с кровотоком доставляются в ткань головного мозга.

Присутствие алкогольдегидрогеназы (КФ 1.1.1.1.) в мозгу впервые обнаружено методом, основанным на сочетанном окислении этанола до ацетальдегида и восстановлении L-лактальдегида до 1,2-пропандиола [10] с колориметрическим определением его количества [11]. Последующее изучение сопряженной реакции показало, что получаемые таким путем результаты малодостоверны, так как в большей степени отражают обмен лактальдегида, чем этанола [12].

Необходимо критически рассматривать и показатели определения активности алкогольдегидрогеназы (АДГ) в гомогенатах мозга прямым

спектрофотометрическим методом по восстановлению NAD или окислению NADH [13]. Мозг обладает высокой скоростью биосинтеза NADH из NAD за счет других оксидоредуктаз, а скорость реакции почти не снижается в присутствии ингибитора фермента—пиразола [12, 14]. Применение частичной очистки [15] увеличивает достоверность результатов спектрофотометрического измерения активности АДГ, но при этом не исключается возможность загрязнения препарата ферментом крови.

Цель настоящего сообщения—выяснение вопроса о присутствии АДГ в ткани мозга с учетом высказанных замечаний и изучение некоторых свойств этого фермента.

Материалы и методы

В качестве источника фермента использовали мозг белых беспородных крыс и быка. Исследования проводили одновременно на отмытой и неотмытой от крови ткани (с предварительной перфузией мозга или без нее), сосудах и капиллярах мозга, гемолизате и сыворотке крови. Сосуды и крупные капилляры удаляли методом Joo, Karnushina [16], последовательно продавливая мозг через сита с диаметром пор соответственно 1000, 350 и 110 мкм. Ткань мозга гомогенизировали в среде, содержащей 0,32 М сахарозы, 0,005 М пирофосфата натрия, 0,001 М ЭДТА, 0,002 М цистеин гидрохлорида (pH 8,9), и центрифугировали 20 мин при 20000 g, а затем в течение 1 ч при 105000 g на центрифуге VAC-601 (ГДР). Осадок отбрасывали, а к супернатанту при помешивании добавляли сульфат аммония до полного насыщения раствора. Смесь центрифугировали, осадок растворяли в минимальном объеме 0,005 М натрий-пирофосфатного буферного раствора, содержащего 0,001 М ЭДТА, 0,002 М цистеин гидрохлорида и 0,2 М NaCl (pH 8,9) и наносили на колонку (1,7×90 см) с сефадексом G-200, уравновешенную этим же буфером. Белок элюировали исходным буферным раствором. Скорость тока жидкости через колонку 3 мл/ч, объем фракций 2 мл.

После продавливания через сита чистоту отмывки ткани от эритроцитов оценивали под микроскопом. Содержание гемоглобина в гомогенате определяли колориметрически при 660 нм. Удаление гемоглобина после центрифугирования гомогената осуществляли смесью этанол: хлороформ в соотношении 2 : 1. Оставшиеся на ситах сосуды и капилляры обрабатывали по методике, описанной Joo, Karnushina [16]. Сыворотку крови получали осаждением форменных элементов крови в течение 20 мин при 1500 об/мин. Гемолиз эритроцитов проводили по методу Лишко и соавт. [17]. Все этапы обработки сосудов, мозга и крови осуществляли на холоду.

Активность АДГ определяли по скорости образования NADH в стандартных условиях [13]. Концентрацию его рассчитывали по формуле:

$$[NADH]_{мкмоль} = \frac{\Delta D_{340}}{6,22} \cdot V,$$

где ΔD_{340} — изменение оптической плотности при 340 нм, V—объем пробы

Измерения проводили на двухлучевом регистрирующем спектрофотометре «Perkin-Elmer-420» (Швеция). У. А. фермента выражали в мкмоль NADH /ч/ мг белка при 37°. Концентрацию белка определяли методом Lowry и соавт. [18] и по поглощению в УФ-области при 280 нм.

Диск-электрофорез (30—90 мкг белка) в 7%-ном ПААГ (pH 8,9) выполняли при силе тока 2 мА на трубку в первые 20 мин, а затем 4 мА на трубку в течение 2 ч [19]. Белковые полосы проявляли 0,1%-ным раствором Кумасси R-250 на 30%-ном растворе трихлоруксусной кислоты в течение 20—30 мин. Для определения локализации фермента в ПААГ и выяснения наличия множественных форм АДГ извлеченный из трубок (0,5×7 см) гель либо разрезали на отдельные диски толщиной 1 мм и в них определяли активность фермента в стандартных условиях, либо белковые полосы окрашивали непосредственно в геле в присутствии протопереносящих красителей—феназинметосульфата (ФМС) и нитротетразолиевого синего (НТС). Во втором случае гели инкубировали 5—10 мин при 37° в 0,01 М натрий-пирофосфатных буферных растворах (pH 8,9), содержащих: 0,002 М NAD, 0,1 М C_2H_5OH, 0,025 М семикарбазид, 0,001 М ФМС, 0,01 М НТС (*1*); 0,002 М NAD, 0,25 М семикарбазид, 0,001 М ФМС, 0,01 М НТС (*2*); 0,1 М C_2H_5OH, 0,25 М семикарбазид, 0,001 М ФМС, 0,01 М НТС (*3*); 0,002 М NAD, 0,1 М C_2H_5OH, 0,25 М семикарбазид, 0,001 М ФМС, 0,01 М НТС, 0,02 М пиразол (*4*); 0,002 М NAD, 0,001 М ацетальдегид, 0,001 М ФМС, 0,01 НТС и 0,02 М пиразол (*5*).

После появления сине-лиловых полос восстановленного НТС гели промывали и хранили в смеси метанол : вода : глицерин : ледяная уксусная кислота в соотношении 50 : 50 : 20 : 1.

Результаты и обсуждение

Активность АДГ была обнаружена в гомогенатах мозга и сыворотке крови (табл. 1), причем в отмытом от крови мозгу после удаления гемоглобина она равнялась таковой у неотмытой ткани. Исследование отмытой ткани под микроскопом выявило наличие лишь отдельных эритроци-

Таблица 1

Активность алкогольдегидрогеназы в тканях крыс

Исследуемая ткань	У. А., ед/мг белка
Отмытая от крови ткань мозга	0,011±0,002
Неотмытая ткань мозга	0,010±0,002
Сосуды и капилляры мозга	0
Гемолизат крови	0
Сыворотка крови	0,0040±0,0025

тов, а содержание гемоглобина в отмытом гомогенате не превышало 2—3% от исходного. Известно, что мозг содержит различные системы ферментов, которые могут быстро утилизировать малые концентрации

NADH, возникающего при окислении этанола до ацетальдегида [10, 12]. В отсутствие семикарбазида, реагирующего с продуктом реакции—ацетальдегидом и сдвигающего равновесие системы в сторону образования NADH, воспроизводимость данных снижается.

Удаление эндогенных субстратов и ингибиторов фермента высаливанием гомогената мозга сульфатом аммония не приводило к существенному увеличению активности АДГ (табл. 2), однако полученные показатели были более стабильными. При последующей гель-фильтрации на колонке с сефадексом G-200 белки мозга элюировались четырьмя пиками (рис. 1), активность АДГ выявляли на спаде второго пика. Полученный фермент имел У. А. в 21 раз выше, чем в исходном гомогенате, а выход фермента составлял 36% (табл. 2).

Таблица 2

Очистка алкогольдегидрогеназы из мозга крысы

Этапы очистки	Объем, мл	Белок, мг/мл	Активность, ед	У. А., ед/мг белка	Степень очистки	Выход, %
Гомогенат	350	5,8	23,0	0,001	—	100
Высаливание $(NH_4)_2SO_4$	12	130	21,8	0,014	1,3	94
Гель-фильтрация на сефадексе G-200	21	1,7	8.28	0.23	21	36

Примечание. Приведены усредненные данные, полученные в опытах на 6 группах животных, по 20 особей в каждой

Частично очищенный препарат отличался неустойчивостью при хранении. Скорость инактивации белка зависела от pH буферного раствора и концентрации присутствующих в нем тиоловых соединений, защищающих SH-группы АДГ от окисления.

Активность фермента в гомогенате сосудов и гемолизате крови не обнаружена и после фракционирования надосадочной жидкости сульфатом аммония с последующей гель-фильтрацией через сефадекс G-200; в сыворотке крови по мере дальнейшей очистки она не выявлялась или была незначительной. Полученные данные свидетельствуют об отсутствии в крови и сосудах мозга ферментных систем, способных окислять этанол и подтверждают мнение Rix [9] о появлении АДГ в крови только при патологических изменениях печени.

Из-за низкой концентрации фермента в мозгу крыс и дополнительного разбавления раствора при элюции с колонки возникали определенные трудности при определении активности АДГ. Поэтому в дальнейших исследованиях было решено использовать более крупный объект—мозг быка. При определении активности фермента в гомогенате мозга быка и после очистки сульфо-аммонийной пасты на колонке с сефадексом G-200 были получены результаты, аналогичные представленным в

табл. 1. В данном случае использовали ткань мозга, очищенную от оболочек и сосудов, но неполностью отмытую от крови. В связи с этим была проведена дополнительная проверка на присутствие АДГ в крови и сосудах, в результате которой активность фермента или не была обнаружена, или была в пределах ошибки опыта.

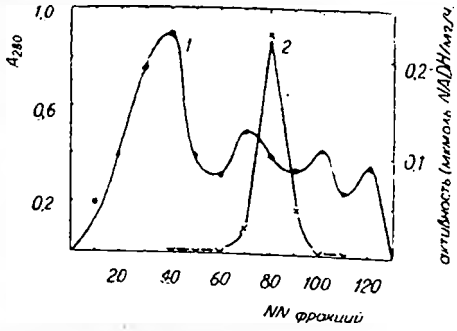

Рис. 1. Гель-фильтрация алкогольдегидрогеназы мозга крысы на колонке с сефадексом G-200. *1*—поглощение при 280 нм; *2*—ферментативная активность

Частичная очистка фермента, выделенного из мозга быка, позволила исследовать зависимость скорости реакции от pH среды, содержания ферментного белка и времени инкубации при постоянной концентрации всех компонентов системы. Из данных, представленных на рис. 2, видно, что максимальное окисление этанола наблюдается при pH 9,8—10,0. Проявление активности АДГ в относительно узкой щелочной зоне pH и быстрая инактивация при pH ниже 8,0 позволяют предположить, что фермент реакционноспособен только в одном состоянии ионизации, и его активность в значительной мере определяется ионизацией двух аминокислотных остатков в активном центре или поблизости от него в области оптимума ферментативной реакции [20]. К числу их могут быть отнесены ε-аминогруппа лизина и фенольный гидроксил тирозина.

Данные, характеризующие ход реакции во времени, представленные на рис. 3, свидетельствуют, что количество возникающего при окислении этанола NADH было прямо пропорционально времени инкубации в течение 1 ч, после чего У. А. АДГ возрастала незначительно. Линейный характер зависимости скорости реакции от содержания фермента в пробе соблюдался до концентрации белка 0,42 мг/мл (табл. 3).

Пиразол является конкурентным ингибитором АДГ [14, 21]. При концентрациях пиразола 2 и 4 мкМ скорость окисления этанола снижалась в наших опытах соответственно на 60 и 100%. Согласно данным, полученным на частично очищенных препаратах мозга, реакция полностью ингибировалась 2 мкМ пиразола [15], тогда как в гомогенатах тканей торможение скорости на 50% наблюдалось только при концентрации 50 мкМ пиразола [21]. По-видимому, такая разница объясняется недо-

статочной специфичностью метода определения количества образовавшегося NADH в гомогенатах мозга и наличием множественных форм фермента, отличающихся своей чувствительностью к ингибитору.

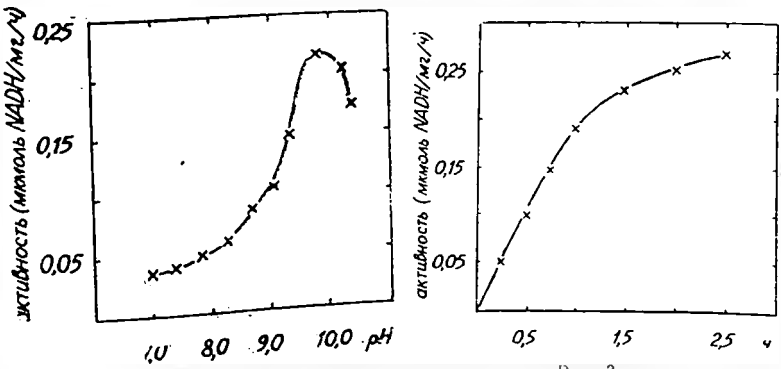

Рис. 2. Рис. 3.

Рис. 2. Зависимость скорости реакции, катализируемой алкогольдегидрогеназой из мозга быка от pH.

Примечание. Активность фермента определяли в 0,01М натрий-пирофосфатном буфере pH 8,9, содержащем 0,1М семикарбазид, через каждые 0,4, а в области максимума — 0,2 единицы pH.

Рис. 3. Зависимость скорости окисления этанола алкогольдегидрогеназой мозга быка от времени инкубации.

Таблица 3

Зависимость скорости реакции, катализируемой алкогольдегидрогеназой мозга быка, от концентрации ферментного белка

Белок, мкг/мл	Активность, ед	У. А., ед/мг
110	0,025	0,23
220	0,050	0,23
420	0,092	0,22
540	0,108	0,20
690	0,124	0,18
790	0,122	0,16
820	0,111	0,13

Изучение активности АДГ в целом мозгу быка и различных его отделах после гель-фильтрации на колонках с сефадексом G-200 показало, что фермент локализован во всех отделах (табл. 4), однако наибольшая активность была выявлена в больших полушариях переднего мозга и мозжечке. Наблюдаемые различия в активности фермента особенно отчетливо проявлялись при исследовании гомогенатов тканей (опыты проводились на целом мозгу и мозжечке). Сравнительный анализ профилей элюции белков, разделенных по величине M_r на сефадексе G-200, позволил установить, что в первом пике (рис. 1) вымываются, в основном,

Таблица 4

Локализация алкогольдегидрогеназы в различных отделах мозга быка

Исследуемая ткань	У. А. в гомогенате ткани, ед/мг	У. А. после очистки на G-200, ед/мг
Целый мозг	0,011	0,15
Мозжечок	0,026	0,17
Белое вещество больших полушарий переднего мозга	—	0,16
Серое вещество больших полушарий переднего мозга	—	0,13
Гипоталамус	—	0,07
Продолговатый мозг	—	0,10
Средний мозг	—	0,10

нуклеопротеиды, концентрация которых в исследуемых тканях была более вариабельной, чем концентрация белков в других пиках, что приводило к усреднению результатов, полученных при определении скорости окисления этанола в различных отделах мозга. У взрослых крыс, получавших в 54 поколениях 12%-ный раствор этанола как единственный источник жидкости, наибольшая активность найдена в подбугорной области головного мозга, а у новорожденных животных, предыдущие поколения которых потребляли такой же раствор алкоголя,—в мозжечке [22]. Иммуноцитохимическими методами показано, что АДГ присутствует в нейронах и отсутствует в глиальных клетках [23].

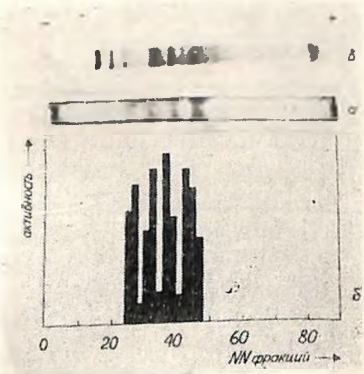

Рис. 4. Зоны активности алкогольдегидрогеназы мозга быка в ПААГ, определяемые в присутствии протонпереносящих красителей (*а*), в стандартных условиях (*б*) и расположение белковых полос в геле (*в*) после окрашивания Кумасси R-250.

Гетерогенность фермента из различных источников доказана электрофоретическими и хроматографическими исследованиями [24, 25]. Для выявления различных форм фермента в мозгу быка был использован метод диск-электрофореза в сочетании с реакцией ферментативного окисления этанола под действием АДГ в присутствии ФМС и НТС. Инкубация геля в буферной системе 1 (см. «Материалы и методы») приводила к образованию четырех, а в некоторых опытах шести хорошо окрашенных полос восстановленного НТС (рис. 4, *а*). Полосы не обнаруживались при отсутствии в реакционной смеси одного из субстратов или внесении конкурентного ингибитора фермента—пиразола. Появление нескольких полос в об-

ласти локализации белков с высокой величиной M_r при инкубации геля в системе ацетальдегид-NAD обусловлено присутствием в частично очищенных препаратах фермента альдегиддегидрогеназы.

При разделении гелей на диски и определении в них активности АДГ в стандартных условиях также обнаружено наличие 4—6 ферментативных зон (рис. 4, *б*). Местонахождение зон хорошо соответствует расположению окрашенных полос, образующихся в присутствии протонпереносящих красителей и белковых полос, проявляющихся при окраске гелей Кумасси R-250 (рис. 4, *а, б, в,*). Таким образом, фермент из мозга быка существует в виде множественных форм.

Увеличение активности по мере очистки фермента и ее отсутствие в крови и сосудах мозга, линейная зависимость скорости реакции от концентрации белка и времени инкубации, а также ингибирование системы пиразолом свидетельствуют о том, что ткань мозга способна окислять этанол и данный процесс катализируется, в основном, АДГ мозга; это подтверждают и результаты электрофоретических исследований.

EVIDENCE OF THE PRESENCE OF ALCOHOL DEHYDROGENASE IN RAT AND BOVINE BRAIN

CHERNIKEVICH I. P., LOMEKO I. E., VOSKOBOYEV A. I., OSTROVSKY Yu. M.
Division of Metabolic Regulation, Belorussian SSR Academy of Sciences, Grodno

The presence of alcohol dehydrogenase (EC 1. 1. 1. 1.) has been established in rat and bovine brain tissue and the absence of it in brain vessels and blood. The enzyme was purified 21-fold with 36% yield from both objects under study. The dependence of the reaction rate on the pH, the amount of protein, the incubation time and concentration of a competitive inhibitor, pyrazole, has been followed. The enzyme is detected in all brain areas tested. However, the greatest activity has been revealed in the forebrain cortex and cerebellum. Some isoforms of the enzyme have been detected. The conclusion is drawn that brain tissue is capable of oxidizing ethanol and that the process is mainly catalyzed by alcohol dehydrogenase.

ЛИТЕРАТУРА

1. The Biology of Alcoholism (Kissin B., Begleiter H., eds), v. I, 631 p. N. Y.—L. Plenum Press, 1971.
2. Alcohol and Aldehyde Metabolizing System (Thurman R. G., Williamson J. R., Drott H. R. eds.), III, 673 p., N. Y., Acad. Press, 1977.
3. *Гуртовенко В. М.*—В сб.: Проблемы патогенеза психических заболеваний (под ред. Г. В. Морозова), с. 97—107, М., 1979.
4. *Clarke D. D., Ronan E. J., Tirr L., Dicker E.* Abstr. Fourth Meet. Internat. Soc. Neurochem., p. 472, 1973.
5. *Masoro E. J., Abramovitch H., Birchard J. R.* Amer. J. Physiol., *173*, 37—40, 1953.

6. *Bartlett G. R., Barnet H. N.* Quart. J. Stud. Alc., *10*, 381—397, 1959.
7. *Majchrowicz E.* Canad. J. Biochem., *13*, 1041—1051, 1965.
8. *Mukherji B., Kashiki J., Ohyanagi, Sloviter H. A.*—In: Abstr. Fourth Meet. Internat. Soc. Neurochem., p. 473, 1973.
9. *Rix K. S. B.* Alcohol and Alcoholism. Montreal, Eden Press, 1977.
10. *Raskin N., Sokoloff L.* Science, *162*, 131—132, 1968.
11. *Gupta N., Robinson D.* Biochim. et biophys. acta, *118*, 431, 1966.
12. *Tabakoff B., Gelpke C. C.*—In: Biochemical Pharmacology of Ethanol (Majchrowicz E., ed.), p. 111—140, N. Y.—L., Plenum Press, 1975.
13. *Bonnichsen P., Brink N.*—In: Methods in Enzymology (Colowick S., Nathan N., eds.), v. 1, p. 495, 1955.
14. *Faberner P. V.* Biochem. Pharmacol., *23*, 1219—1220, 1974.
15. *Tabakoff B., Wartburg J. P.* Biochem. and Biophys. Res. Communs., *63*, 957—966, 1975.
16. *Joo F., Karnushina I.* Cytobios, *8*, 41—48, 1973.
17. *Лишко В. К., Малышев М. К., Гревизарская Г. М.* Биохимия, *1*, 60, 1974.
18. *Lowry O. H., Rosenbrough N. J., Farr A. L., Randall R.* J. Biol. Chem., *193*, 265, 1951.
19. *Ornstein L., Davis B. J.* Ann. N. Y. Acad. Sci., *121*, 305—320, 1964.
20. *Диксон М., Уэбб Э.*— В кн.: Ферменты, с. 112, М., Изд-во иностр. литературы, 1961.
21. *Raskin N., Sokoloff L.* J. Neurochem., *17*, 1677—1687, 1970.
22. *Rodrigo R., Egana E.* J. Neurochem., *25*, 645—647, 1975.
23. *Goldstein B., Maxwell D. S.* Pharm. Biochem. and Behav., *14*, 761—770, 1981.
24. *Erwin V. S., Deitrich A.* Biochem. Pharmacol., *21*, 2915—2924, 1972.
25. *Smith M., Hopkinson D. A., Harris H.* Ann. Human Genet., 35, 243—253, 1972.

Поступила 14. IX 1983