

МОЛЕКУЛЯРНО-БИОХИМИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ АЛКОГОЛЬДЕГИДРОГЕНАЗЫ У ЭВОЛЮЦИОННО УДАЛЕННЫХ МОДЕЛЬНЫХ ОРГАНИЗМОВ

П. Ю. Пинчук

*Витебский государственный университет имени П.М. Машерова,
Витебск, Республика Беларусь*

Введение. Понимание межвидовых различий в метаболизме этанола имеет важное значение для различных областей знаний, включая токсикологию, фармакологию и эволюционную биологию. В данной статье представлены результаты исследования, направленные на изучении биохимических параметров ключевого фермента этого процесса – алкогольдегидрогеназы (АДГ).

Цель исследования. Определить зависимость показателей активности АДГ от молекулярной структуры, а также установить эволюционные взаимосвязи у исследуемых организмов для выявления механизмов, лежащих в основе межвидовых различий в метаболизме этанола.

Материал и методы. Для множественного выравнивания аминокислотных последовательностей АДГ, построения филогенетического дерева и моделирования трехмерных структур фермента использовались общедоступные базы данных (UniProt, NCBI) и онлайн-инструменты (BLAST, MEGA X, PhyML, Clustal Omega, TranslatorX, ProtParam, TMHMM 2.0, SWISS-MODEL). Активность алкогольдегидрогеназы определяли в тканях печени крыс и гепатопанкреасе моллюсков спектрофотометрическим методом.

Результаты. Сравнительный анализ алкогольдегидрогеназы у шести модельных организмов и человека выявил межвидовые различия в активности фермента, его аминокислотном составе и молекулярном строении, что указывает на эволюционные изменения метаболических процессов этанола к изменяющимся условиям среды у живых организмов.

Заключение. Полученные данные расширяют понимание механизмов метаболизма этанола и подчеркивают роль структурных особенностей АДГ в формировании видовой специфичности, что имеет важное значение для токсикологии, фармакологии и эволюционных процессов. Ключевые аминокислотные замены в активном центре фермента, установленные во время сравнительного анализа, могут служить молекулярной основой адаптации к видовым особенностям детоксикации ксенобиотиков. Кроме того, филогенетические данные указывают на дивергенцию гена *ADH*, связанную с экологическими факторами, что подтверждает роль естественного отбора в эволюции ферментативной системы.

Ключевые слова. Алкогольдегидрогеназа, молекулярная эволюция, филогенетический анализ, модельные организмы, метаболизм этанола.

Для цитирования: Пинчук, П. Ю. Молекулярно-биохимический анализ алкогольдегидрогеназы у эволюционно удаленных модельных организмов / П. Ю. Пинчук // Биохимия и молекулярная биология. – 2025. – Т. 4, № 1(6). – С. 50–

Введение

Алкогольная зависимость остается глобальной медицинской проблемой, приводящей к тяжелым соматическим и психическим нарушениям. Несмотря на достижения в изучении метаболизма этанола, патогенез алкоголь-ассоциированных заболеваний требует дальнейшего исследования. Токсическое действие этанола на организм определяется его фармакокинетикой: после перорального приема 80 % алкоголя абсорбируется в тонком кишечнике путем пассивной диффузии, достигая пиковой концентрации в крови через 30–90 мин. Метаболизм 95–98 % этанола осуществляется в печени при участии ферментативных систем, включая алкогольдегидрогеназу (АДГ), альдегиддегидрогеназу (АЛДГ), цитохром р450 2Е1 (СУР2Е1) и каталазу [1].

Алкогольдегидрогеназа – цинк-зависимый фермент, локализованный в цитоплазме. Он окисляет этанол до ацетальдегида с использованием NAD^+ в качестве кофермента. У человека выделяют пять классов АДГ, среди которых ключевую роль в метаболизме этанола выполняют изоформы класса I (*ADH1A*, *ADH1B* и *ADH1C*), кодируемые полиморфными генами, влияющими на скорость окисления спирта [2]. Класс II (АДГ4), экспрессируемый в печени, обладает низкой аффинностью к этанолу, в отличие от класса III (АДГ5), для которого характерно структурное сходство с глутатион-зависимыми формальдегиддегидрогеназами растений и дрожжей, что подчеркивает его эволюционную консервативность [3].

При хронической интоксикации активируется микросомальный цитохром СУР2Е1, окисляющий

этанол до ацетальдегида с генерацией реактивных кислородных радикалов. Детоксикация ацетальдегида осуществляется митохондриальной альдегиддегидрогеназой 2 (АЛДГ2), которая превращает его в ацетат с образованием NADH [4].

Токсичность этанола обусловлена действием его метаболитов и нарушением клеточного гомеостаза. Ацетальдегид образует ковалентные аддукты с белками, нарушая их функцию, и участвует в синтезе сальсоинола – соединения, потенциально способствующего развитию зависимости. Накопление NADH нарушает функционирование цикла трикарбоновых кислот, что приводит к жировой дистрофии гепатоцитов. Ацетат, метаболизируемый в периферических тканях до углекислого газа, в высоких концентрациях угнетает активность центральной нервной системы и модулирует печеночный кровоток через вазодилатацию. Комплексное взаимодействие этих механизмов лежит в основе патогенеза алкоголь-индуцированных поражений, включая гепатомегалию, кардиомиопатию и нейродегенеративные изменения [5].

Таким образом, изучение молекулярных основ токсичности этанола остается критически важным для разработки терапевтических методов.

Цель исследования. Установить, как различия в структуре и свойствах алкогольдегидрогеназы III класса у эволюционно удаленных организмов влияют на ее функцию, определяя адаптацию к разным экологическим условиям.

Материалы и методы

Для проведения филогенетического анализа фермента были использованы аминокислотные последовательности человека (*Homo sapiens*) и шести модельных организмов: *Rattus norvegicus*, *Danio rerio*, *Biomphalaria glabrata*, *Lymnaea stagnalis*, *Drosophila melanogaster* и *Caenorhabditis elegans*.

Аминокислотная последовательность человека была получена из базы данных UniProt (ID: P11766) и использовалась в качестве шаблона. Для отбора гомологичных последовательностей других организмов был проведен поиск в базе данных Национального центра биотехнологических информационных (NCBI) с использованием инструмента BLAST и его алгоритмов blastp и tblastn. Для обеспечения высокой достоверности результатов пороговое значение ожидаемого числа (E-value) установлено на уровне 1×10^{-5} .

При проведении филогенетического анализа руководствовались следующими методами [6]:

Метод соседнего присоединения (Neighbor joining, NJ). Филогенетическое дерево было построено в программе MEGA X с использованием p-distance для оценки расстояния, скорректирован-

ного по Пуассону для учета множественных заменений. Надежность ветвей оценивалась с помощью бутстреп-анализа (1000 реплик).

Метод максимального или наибольшего правдоподобия (Maximum likelihood estimation, ML). Филогенетическое дерево было построено в программе PhyML. Поддержка ветвей оценивалась с помощью приближенного теста отношения правдоподобия (aLRT).

Множественное выравнивание аминокислотных последовательностей проводилось на сервере Clustal Omega. Использование программы TranslatorX позволило устранить несоответствия между выравниваниями нуклеотидных и аминокислотных последовательностей.

Физико-химические свойства АДГ анализировали с использованием инструмента ProtParam (ExPASy) [7]. Для каждого организма вводили его аминокислотную последовательность, полученную ранее из базы данных NCBI. Программа автоматически рассчитывала молекулярную массу (мол. масса), теоретическую изоэлектрическую точку (pI), индекс нестабильности, алифатический индекс и индекс гидропатичности (GRAVY). Стабильность белка определяли на основе порогового значения индекса нестабильности, где значения <40 соответствовали стабильной форме, а ≥ 40 – нестабильной.

Изучение структурных особенностей АДГ5 включало анализ трансмембранных доменов для подтверждения цитоплазматической локализации фермента. Данный анализ проводили с использованием программы TMHMM 2.0 у семи исследуемых организмов. Критерием цитоплазматической локализации считалось отсутствие предсказанных ТМН (Transmembrane Helices) и низкую вероятность N-концевой локализации внутри мембраны (N-in $<0,5$).

Моделирование третичной структуры алкогольдегидрогеназы выполнено в автоматическом режиме на платформе SWISS-MODEL с использованием структуры фермента человека (AlphaFold: AF-P11766-F1-v4), как шаблон. Качество моделей оценено по параметрам MolProbity: общая оценка, доля благоприятных областей Рамачандрана, наличие цис-пептидов и отклонение β -углеродов.

Биохимический анализ активности фермента проведен на двух группах животных: 10 половозрелых самцов крыс (*Rattus norvegicus*) и 10 особей моллюска *Lymnaea stagnalis*. Ткани печени крыс и гепатопанкреаса моллюсков гомогенизировали в следующих буферах: для крыс – 0,1М глицин-NaOH (pH 9,0), для моллюсков – 0,02М Трис-HCl (pH 7,5) с добавлением 0,01М ЭДТА и 0,25М сахарозы. Центрифугировали гомогенаты при 10 000 g, 4 °C, 15 мин. Надосадочную жид-

кость (супернатант) использовали для измерения активности фермента. Объем реакционной смеси составил 3,0 мл. У крыс реакционная смесь содержала 0,1М Глицин-NaOH буфер (pH 9,0), 0,04М NAD⁺, 0,75М этанол, 0,001М CaCl₂ и супернатант [8]. Для моллюсков смесь включала 0,02М Трис-HCl буфер (pH 7,5), 1М этанол, 0,1М NAD⁺ и супернатант. Активность фермента измеряли спектрофотометрическим методом при длине волны 340 нм, температура 30 °С за 1 минуту (превращение 1 мкмоль NAD⁺ в NADH за 1 мин = 1 Ед). Статистическая обработка данных выполнена в программе GraphPad Prism. Нормальность распределения проверена тестом Шапиро-Уилка (p > 0,05). Для сравнения групп использовали непарный t-критерий Уэлча с уровнем значимости p < 0,05. Эффект размера рассчитан по Коэну. Данные представлены как среднее стандартное отклонение (SD).

Результаты и их обсуждение

Филогенетический анализ алкогольдегидрогеназы III класса выявил статистически значимое разделение исследуемых видов на две эволюционные группы: позвоночные (Bootstrap = 96–100 %, aLRT > 0,95) и беспозвоночные животные (Bootstrap = 100 %), что подтверждается двумя методами (NJ и ML) (рисунок 1).

Низкая поддержка узла, объединяющего эти группы (Bootstrap = 49 %), свидетельствует о сложностях в реконструкции их эволюционных связей, вероятно связанных с ускоренной дивергенцией АДГ у *Drosophila melanogaster* и *Caenorhabditis elegans* (длина ветвей равна 0,125–0,150), что коррелирует с экстремально высоким GC-составом третьей позиции кодонов (78,49 % и 57,06 % соответственно). У *Biomphalaria glabrata* зафиксирован минимальный GC-состав (34,14 %), характерный для АТ-богатых геномов.

Физико-химические свойства фермента показали сохранение длины аминокислотных последовательностей

и молекулярной массы у всех исследуемых видов (таблица).

Наиболее выраженные межвидовые различия выявлены по показателю изоэлектрической точки. У млекопитающих pI находится в нейтральном диапазоне (7,2–7,5), когда у моллюсков (5,89–6,34) и нематоды (5,96) наблюдалось смещение в кислую область, что соответствует особенностям физиологической среды их тканей. Все исследуемые белки стабильны (индекс нестабильности < 32), при этом максимальные значения устойчивости зафиксированы у *Drosophila melanogaster* (20,72), а минимальные у *Caenorhabditis elegans* (31,78). Показатель гидрофобности находится в диапазоне от 0,033 (*Lymnaea stagnalis*) до 0,158 (*Homo sapiens*), что свидетельствует о преобладании гидрофильных свойств у АДГ.

Анализ трансмембранных доменов с использованием алгоритма ТМНММ 2.0 подтвердил, что АДГ у всех исследуемых организмов является растворимым цитоплазматическим ферментом. Во всех случаях количество предсказанных трансмембранных доменов (TMN) равно 0, а вероятность N-концевой локализации внутри мембраны (N-in) была низкой (0,085–0,032). Наибольшее количество ТМН отмечено у человека (10,15), у моллюсков и нематоды значения ниже (3,88–5,77), что дополнительно подтверждает отсутствие трансмембранных структур.

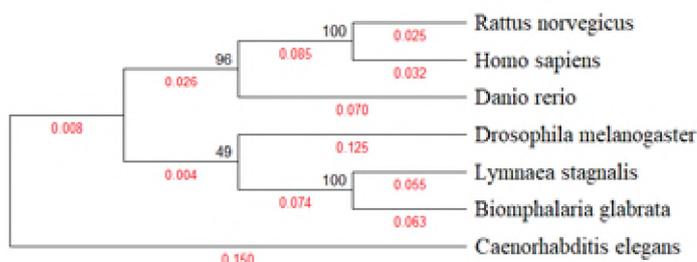


Рисунок 1 – Филогенетическое дерево, построенное методом соседнего присоединения

Figure 1 – Phylogenetic tree reconstructed using the Neighbor-Joining method

Таблица – Показатели физико-химических свойств алкогольдегидрогеназы у эволюционно удаленных организмов

Table – Physicochemical properties of alcohol dehydrogenase in evolutionarily divergent organisms

Организмы	Мол. масса (кДа)	pI	Индекс нестабильности	GRAVY	Алифатический индекс
Homo sapiens	39,7	7,45	30,50	0,158	91,47
Rattus norvegicus	39,6	7,45	27,28	0,142	88,61
Danio rerio	39,5	7,21	21,49	0,058	84,85
Biomphalaria glabrata	39,8	6,34	29,85	0,052	83,33
Lymnaea stagnalis	39,9	5,89	28,96	0,033	82,55
Drosophila melanogaster	39,6	6,50	20,72	0,071	91,21
Caenorhabditis elegans	40,3	5,96	31,78	0,053	86,29

Структурное сходство алкогольдегидрогеназы III класса лабораторной крысы и человека составило 94,4 %, с полным сохранением Zn²⁺-связывающих сайтов (Cys45, His67, Cys174) и NAD⁺-связывающего домена (His46, Gly270, Val294). У *Biomphalaria glabrata* (гомология 71,77 %) и *Lymnaea stagnalis* (гомология 73,39 %) выявлены ключевые адаптации: замена Tyr93→Ser и модификация Leu110, расширяющая спектр метаболизируемых субстратов и меньшее значение активности фермента по сравнению с млекопитающими. Качество моделей, оцененное по MolProbity соответствует критериям достоверности: оценка MolProbity <2,0 (0,86–1,21), доля благоприятных областей Рамачандрана >96 %, отклонение β-углеродов ≤4. Наилучшие показатели у моллюска *Biomphalaria glabrata* (MolProbity = 0,86, отклонение β-углеродов = 1) указывают на эволюционную стабилизацию структуры фермента, когда у *Lymnaea stagnalis* обнаружен непролиновый цис-пептид (1/709), что может отражать адаптацию к альтернативным субстратам.

В ходе статистического анализа были определены достоверные различия в активности алкогольдегидрогеназы между исследуемыми группами. Активность фермента в тканях печени крыс (48,04±1,887 Ед) значительно превышает активность в тканях гепатопанкреаса моллюсков (37,37±4,207 Ед) по результатам двустороннего t-критерия Уэлча (p = 0,033). Разница между средними составила 10,76 Ед (95 % ДИ: 0,99–20,36), что объясняет 22,9 % общей вариабельности данных (R² = 0,229). Тест Левена подтвердил неравенство дисперсий между группами (F = 4,972, p = 0,026), что потре-

бовало применения поправки t-критерия Уэлча (рисунок 2а).

Распределение данных в обеих группах соответствовало нормальному (тест Шапиро-Уилка: p = 0,852 для крыс, p = 0,177 для моллюсков). У крыс значения активности более однородные (SD = 5,966), тогда как у моллюсков наблюдался значительный разброс (SD = 13,33). Медианные значения АДГ составили 48,98 Ед (крысы) и 38,42 Ед (моллюски), что соответствует выявленной разнице средних значений. Согласно данным гистограмм, 75 % данных (крысы) находятся в диапазоне 43,29–51,37 Ед, когда у моллюсков 75 % значений находятся между 23,11 и 49,49 Ед (рисунок 2б). Максимальное значение активности у крыс (58,36 Ед) почти вдвое превышает минимальное значение активности фермента у моллюсков (20,22 Ед). Это может быть связано с изменением гидрофобности активного центра, выявленным при моделировании третичной структуры фермента.

Заключение

Полученные данные позволяют определить ключевые закономерности, связывающие структуру фермента, его функцию и адаптацию к различным условиям среды. Филогенетический анализ показал четкое разделение исследуемых организмов на две группы: позвоночные животные с высокой стабильностью АДГ и беспозвоночные животные с выраженной изменчивостью в активном центре. У млекопитающих фермент сохраняет нейтральный заряд и высокую активность в отношении этанола, что обеспечивает его эффективный метаболизм. У моллюсков и нема-

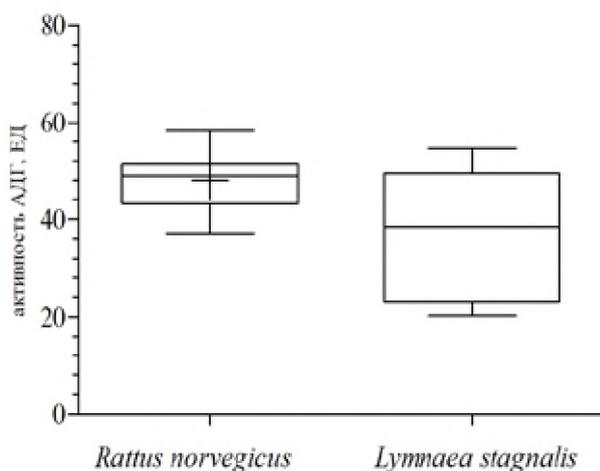


Рисунок 2а – Результаты двустороннего t-критерия Уэлча (p = 0,033)

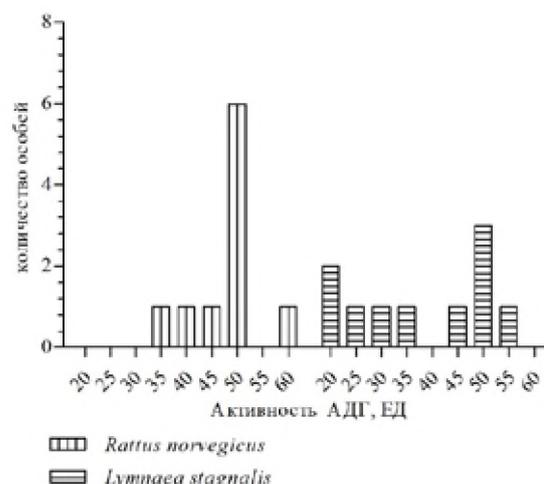


Рисунок 2б – Гистограммы распределения активности АДГ

Figure 2a – Results of the two-tailed Welch's t-test (p = 0,033) Figure 2b – Histograms of ADH activity distribution

тод смещение заряда в кислую область связан с их физиологическими особенностями, что позволяет адаптироваться к иным биохимическим условиям.

Структурные изменения АДГ у моллюсков, например, замена Tyr93→Ser приводят к снижению активности, но при этом увеличивают его способность взаимодействия с разными субстратами. Отсутствие трансмембранных доменов у всех исследуемых видов подтверждает цитоплазматическую локализацию фермента, а различия в GC-составе гена (от 34,14 % до 78,49 %) отражают адаптивные

механизмы: устойчивость к стрессу у *Drosophila melanogaster* и стабильность АТ-богатых геномов у моллюсков.

Установленная связь между гидрофобностью активного центра (GRAVY 0,033–0,158) и субстратной специфичностью объясняет метаболическую адаптацию в разных средах. Результаты исследования не только углубляют понимание молекулярной адаптации, но и открывают возможности для прикладного использования: от разработки биокатализаторов до изучения метаболических нарушений этанола у человека.

Список использованных источников

1. Lehner, T. Alcohol metabolism in alcohol use disorder: a potential therapeutic target / T. Lehner, B. Gao, B. Mackowiak // *Alcohol and Alcoholism*. – 2024. – Vol. 59, №1. – Art. agad077. DOI: 10.1093/alcalc/agad077.
2. Tsermpini, E. E. Alcohol-induced oxidative stress and the role of antioxidants in alcohol use disorder: a systematic review / E. E. Tsermpini, A. Plemenitaš Ilješ, V. Dolžan // *Antioxidants*. – 2022. – Vol. 11, №7. – P. 11. DOI: 10.3390/antiox11071374.
3. Class III Alcohol Dehydrogenase Plays a Key Role in the Onset of Alcohol-Related/-Associated Liver Disease as an S-Nitrosoglutathione Reductase in Mice / T. Haseba, M. Maruyama, T. Akimoto [et al.] // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2023. – Vol. 24, №15. – P. 12102. DOI: 10.3390/ijms241512102.
4. Finelli, R. Impact of alcohol consumption on male fertility potential: a narrative review / R. Finelli, F. Mottola, A. Agarwal // *International Journal of Environmental Research and Public Health*. – 2021. – Vol. 19, №1. – P. 328. DOI: 10.3390/ijerph19010328.
5. Mitochondrial fusion and Bid-mediated mitochondrial apoptosis are perturbed by alcohol with distinct dependence on its metabolism / S. Naghdi, W. S. Slovinsky, M. Madesh [et al.] // *Cell Death & Disease*. – 2018. – Vol. 9, №10. – P. 1028. DOI: 10.1038/s41419-018-1070-3.
6. Costa, K. C. Model organisms to study methanogenesis, a uniquely archaeal metabolism / K. C. Costa, W. B. Whitman // *Journal of Bacteriology*. – 2023. – Vol. 205, №8. – Art. e00115-23. DOI: 10.1128/jb.00115-23.
7. Expasy, the Swiss Bioinformatics Resource Portal, as designed by its users / S. Duvaud, C. Gabella, F. Lisacek [et al.] // *Nucleic Acids Research*. – 2021. – Vol. 49, №W1. – P. W216–W227. DOI: 10.1093/nar/gkab225.
8. Зимин, Ю. В. Способ определения активности алкогольдегидрогеназы: пат. РФ №2036968 С1 / Ю. В. Зимин; заявитель и патентообладатель Ю. В. Зимин. – №5036302/14; заявл. 24.02.1992; опубл. 09.06.1995. – МПК С12N 9/02, С12Q 1/26 // Бюл. изобретений. – 1995. – №16.

References

1. Lehner T, Gao B, Mackowiak B. Alcohol metabolism in alcohol use disorder: a potential therapeutic target. *Alcohol*. 2024;59(1):agad077. doi:10.1093/alcalc/agad077.
2. Tsermpini EE, Plemenitaš Ilješ A, Dolžan V. Alcohol-induced oxidative stress and the role of antioxidants in alcohol use disorder: a systematic review. *Antioxidants*. 2022;11(7):11. doi:10.3390/antiox11071374.
3. Haseba T, Sumida M, Ohno Y, Ishimaru Y, Matsuo Y, Kameyama Y. Class III Alcohol Dehydrogenase Plays a Key Role in the Onset of Alcohol-Related/-Associated Liver Disease as an S-Nitrosoglutathione Reductase in Mice. *Int J Mol Sci*. 2023;24(15):12102. doi:10.3390/ijms241512102.
4. Finelli R, Mottola F, Agarwal A. Impact of alcohol consumption on male fertility potential: a narrative review. *Int J Environ Res Public Health*. 2021;19(1):328. doi:10.3390/ijerph19010328.
5. Naghdi S, Hajnóczky G, Csordás G. Mitochondrial fusion and Bid-mediated mitochondrial apoptosis are perturbed by alcohol with distinct dependence on its metabolism. *Cell Death Dis*. 2018;9(10):1028. doi:10.1038/s41419-018-1070-3.
6. Costa KC, Whitman WB. Model organisms to study methanogenesis, a uniquely archaeal metabolism. *J Bacteriol*. 2023;205(8):e00115-23. doi:10.1128/jb.00115-23.
7. Duvaud S, Gabella C, Lisacek F, Stockinger H, Ioannidis V, Durinx C. Expasy, the Swiss Bioinformatics Resource Portal, as designed by its users. *Nucleic Acids Res*. 2021;49(W1):W216–W227. doi:10.1093/nar/gkab225.
8. Zimin YV. Способ определения активности алкогольдегидрогеназы [Method for determining alcohol dehydrogenase activity]. Patent RU 2036968 C1. 1995 Jun 9.

MOLECULAR AND BIOCHEMICAL ANALYSIS OF ALCOHOL DEHYDROGENASE IN EVOLUTIONARILY DIVERGENT MODEL ORGANISMS

P. Yu. Pinchuk

Vitebsk State University named after P.M. Masharov, Vitebsk, Republic of Belarus

Background. Understanding interspecies differences in ethanol metabolism is critical for fields such as toxicology, pharmacology and evolutionary biology. This study investigates the biochemical parameters of alcohol dehydrogenase (ADH), a key enzyme in this process.

Objective. To determine the relationship between ADH activity molecular structure and to establish evolutionary relationships among the studied organisms, elucidating mechanisms behind interspecific differences in ethanol metabolism.

Material and Methods. Multiple amino acid sequence alignments of ADH, phylogenetic tree construction, and 3D structure modeling were performed using public databases (UniProt, NCBI) and bioinformatic tools (BLAST, MEGA X, PhyML, Clustal Omega, TranslatorX, ProtParam, TMHMM 2.0, SWISS-MODEL). ADH activity was measured spectrophotometrically in rat liver tissue and the hepatopancreas of common pond snail (*Lymnaea stagnalis*).

Results. A comparative analysis of alcohol dehydrogenase in six model organisms and humans revealed interspecies differences in enzyme activity, amino acid composition and molecular structure, indicating evolutionary adaptation in the ethanol metabolic processes to changing environmental conditions organisms.

Conclusions. The obtained data broaden the understanding of ethanol metabolism mechanisms and emphasize the role of structural features of ADH in shaping species specificity, which holds significant implications for toxicology, pharmacology and evolutionary processes. Key amino acid substitutions in the enzyme's active center, identified during the comparative analysis, may serve as a molecular basis for adaptation to species-specific xenobiotic detoxification. Furthermore, phylogenetic data highlight ADH gene divergence linked to ecological factors, supporting the role of natural selection in the evolution of enzymatic systems.

Keywords. Alcohol dehydrogenase, molecular evolution, phylogenetic analysis, model organisms, ethanol metabolism.

For citation: Pinchuk PYu. Molecular and biochemical analysis of alcohol dehydrogenase in evolutionarily divergent model organisms. *Biochemistry and Molecular Biology*. 2025, vol. 4, no. 1(6). pp. 50–55 (in Russian).

Поступила 06.05.2025