

УДК 612.82–092.9:547.262

ОСОБЕННОСТИ АКТИВАЦИИ АЦЕТАТА В ГОЛОВНОМ МОЗГЕ КРЫС С РАЗЛИЧНОЙ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬЮ К НАРКОТИЧЕСКОМУ ДЕЙСТВИЮ ЭТАНОЛА

Ю.В. Киселевский, к.б.н., доцент

Кафедра анестезиологии и реаниматологии с курсом клинической биохимии
«Гродненский государственный медицинский университет»

Настоящее исследование посвящено изучению особенностей активации ацетата в мозге крыс, изначально отличающихся высокой индивидуальной устойчивостью к наркотическому действию этанола. Крысы с изначально низкой чувствительностью к этанолу характеризуются низкой активностью физиологических путей синтеза ацетил-КоА по сравнению с высокочувствительными индивидуумами. В то же время, более высокая активность ацетил-КоА синтетазы у этой группы и увеличение уровня ацетил-КоА в коре мозга на фоне острой алкогольной нагрузки свидетельствует о потенциальной возможности супплементации пула ацетил-КоА из ацетата, которая реализуется в условиях поступления этанола в организм.

Ключевые слова: ацетат, ацетил-КоА, головной мозг, этанол, толерантность.

The present research is devoted to studying of activation peculiarities of acetate in rats' brain initially differing by high individual resistance to ethanol narcotic action. Rats with initially low sensitivity to ethanol are characterised by low activity of physiological ways of Acetyl-CoA synthesis in comparison with high-sensitive individuals. At the same time, higher Acetyl-CoA synthetase activity of this group and the increase of the level of Acetyl-CoA in the brain cortex in acute alcohol intoxication indicate the potential possibility of pool Acetyl-CoA supplementation from acetate which occurs in ethanol entering the organism.

Key words: acetate, Acetyl-CoA, brain, ethanol, tolerance.

Введение

Алкоголизм представляет собой комплексную патологию, которая включает в себя физическую зависимость (оцениваемую выраженностью абстинентного синдрома), толерантность, нарушение контроля над потреблением этанола и/или болезненное влечение к употреблению спиртного [4]. Уже достаточно давно известно о существовании генетической предрасположенности к развитию алкоголизма [6]. Генетический компонент алкоголизма у человека отличается высокой степенью полиморфизма, поэтому для его выяснения необходимо комплексное использование различных подходов к моделированию эффектов этанола. В произвольной популяции крыс, особи изначально (биологически) отличаются по отношению к наркотическому действию этанола. Считается, что особи с изначально низкой чувствительностью к наркотическому действию этанола имеют большую предрасположенность к развитию алкоголизма, чем животные с низкой толерантностью. [14]. Животные с различной чувствительностью к острым эффектам этанола отличаются по скорости метаболизма этанола, функционированию нейротрансмиттерных и нейромодуляторных систем, а также мотивационному влечению к этанолу [9]. Предпочитающие алкоголь животные преимущественно характеризуются коротким временем этанол-индуцированного сна [17]. Для этой группы крыс продемонстрирована более медленная скорость начальных этапов гликолиза, а также установлены особенности обмена некоторых аминокислот и липидов в мозге [17].

Достаточно широко освещались в литературе особенности обмена этанола у животных, разли-

чающихся по предпочтению к этанолу или острым его эффектам. Хорошо изучены начальные этапы метаболизма этанола, а именно, алкогольдегидрогеназная и ацетальальдегиддегидрогеназная реакции. В то же время, связь метаболизма ацетата — непосредственного и значимого, в количественном выражении, продукта метаболизма этанола — в мозге с феноменом толерантности и мотивационного предпочтения у этих групп животных изучены недостаточно. На сегодняшний день целым рядом исследователей продемонстрированы схожие поведенческие эффекты этанола и ацетата [5, 8, 11]. В связи с вышесказанным, можно предположить наличие различий в метаболизме ацетата у животных с различной биологически обусловленной чувствительностью к наркотическому действию этанола, выяснение чего имеет смысл для поиска возможных путей коррекции алкогольной болезни.

Целью настоящей работы являлось изучение особенностей активации ацетата в мозге крыс, изначально отличающихся устойчивостью к наркотическому действию этанола.

Материалы и методы

В экспериментах были использованы белые крысы — самцы линии Wistar с массой 100–120 г, отобранные по признаку длительности этанол-индуцированного сна (4,5 г/кг, 20% раствор, внутрибрюшинно). В группу короткоспящих животных (КС) были включены крысы с длительностью сна 55 ± 11 мин, группу длительноспящих (ДС) животных составили крысы с длительностью сна 220 ± 8 минут. Острую алкогольную интоксикацию осуществляли путем однократного внутрибрюшинного введения крысам 20% раствора этанола в дозе

4,5 г/кг массы тела, за один час до декапитации. Кроме того, в экспериментах использовались крысы генетической линии с различной чувствительностью к действию этанола: HAS (высокочувствительные к эффектам этанола) и LAS (низкочувствительные к эффектам этанола), любезно предоставленные проф. Дитрихом.

Через 2 недели после тестирования животные экспериментальных групп были декапитированы, мозг немедленно извлекали и изолировали следующие регионы: гипоталамус, стриатум, лобная кора, продолговатый мозг, боковая кора. В гомогенатах отделов мозга определяли концентрацию ацетата методом газовой хроматографии. [10] и уровень ацетил-КоА, а также активность пируватдегидрогеназы (КФ 1.2.4.1) и ацетил-КоА синтетазы (КФ 6.2.1.1) спектрофотометрически [15, 16].

Результаты и обсуждение

Длительноспящие животные отличались примерно равным уровнем ацетата во всех исследуемых регионах мозга, за исключением гипоталамуса, где концентрация исследуемого субстрата была практически вдвое меньше по сравнению с другими регионами (таблица 1). Распределение ацетата в мозге короткоспящих крыс не было столь гомогенно, как у длительноспящих, и характеризовалось определенной градиентностью. Так, концентрация ацетата в лобной коре была достоверно выше в сравнении с другими регионами, а также по сравнению с аналогичным регионом длительноспящих животных. Далее, по мере убывания уровня ацетата, следовали стриатум и продолговатый мозг. Гипоталамус, как и в случае длительноспящих крыс, отличался минимальным уровнем ацетата.

В настоящее время известно несколько возможных источников внеклеточного ацетата в мозге. Ацетат может поступать в мозг из периферии, поскольку данная жирная кислота продуцируется анаэробными бактериями в кишечнике, и в норме присутствует в крови в концентрации 0,2–0,3 мМ [12].

Разница в периферической продукции ацетата вряд ли может служить причиной различий в церебральном уровне этого субстрата между экспериментальными группами, поскольку она наблюдалась только в лобной коре. Скорее всего, причиной данного феномена может являться различие в процессах образования ацетата в ткани мозга. Источником образования ацетата в мозге может слу-

Таблица 1 – Концентрация ацетата в мозге (ммоль/г ткани) крыс, отличающихся по наркотическому эффекту этанола в гомогенатах различных регионов мозга при острой алкогольной интоксикации (3,5 г/кг ип, ч/з 60 мин) ($M \pm \omega$, N=7)

Группа	Отдел мозга				
	Лобная кора	Боковая кора	Гипоталамус	Стриатум	Пр. мозг
ДС	0,40±0,07	0,42±0,02	0,24±0,05	0,48±0,07	0,39±0,08
КС	0,62±0,08*	0,45±0,08	0,24±0,03	0,52±0,06	0,36±0,05
ДС+Э	0,72±0,07 ^x	0,81±0,11 ^x	0,47±0,15 ^x	0,85±0,21 ^x	0,83±0,25 ^x
КС+Э	1,01±0,15 ^x	0,92±0,09 ^x	0,48±0,08 ^x	0,88±0,07 ^x	0,86±0,19 ^x

Примечание: ДС – длительноспящие; КС – короткоспящие; +Э – крысы ч/з 60 минут после острого введения этанола (4,5 г/кг, ип), Пр. мозг – продолговатый мозг; * – статистическая разница по отношению к ДС животным ($p < 0,05$); ^x – статистическая разница по отношению к ДС + Э ($p < 0,05$); ^x – статистическая разница по отношению к животным аналогичной группы без острого воздействия этанола ($p < 0,05$)

жить гидролиз ацетилхолина под действием холинэстеразы. Активность данного фермента в структурах коры относительно высока. Ранее показано, что животные, предпочитающие этанол в условиях свободного выбора, характеризуются более высокой активностью ацетилхолинэстеразы в полушариях мозга, а, следовательно, более высокой скоростью гидролиза ацетилхолина до ацетата и холина [11]. Источниками эндогенного ацетата в мозге могут быть также пируват, жирные кислоты, из которых образуется ацетил-КоА, который, в свою очередь, подвергается гидролизу с участием ацетл-КоА гидролазы. Активность этого фермента в головном мозге превышает таковую для ацетил-КоА синтетазы [13].

Острое введение этанола увеличивало уровень ацетата во всех регионах мозга обеих групп животных практически в два раза. При этом сохранялась разница между группами в концентрации ацетата в лобной коре. Кроме того, степень прироста ацетата после введения этанола у КС и ДС животных была неодинакова по регионам. Максимальный прирост отмечался в боковой коре КС животных, в то время как у ДС крыс этанол-индуцируемый рост ацетата был наибольшим в продолговатом мозге.

Наиболее вероятной причиной алкоголь-индуцированного увеличения концентрации ацетата в мозге является поступление его с кровотоком из печени — основного этанол-окисляющего органа. Уровень ацетата в плазме человека увеличивается с 0,3 мМ до 1 мМ после однократного поступления этанола в дозе 0,5 г/кг [12]. Возможности проникновения образующегося на периферии ацетальдегида из крови в ткань мозга крайне ограничены метаболическим барьером для альдегидов представленным альдегиддегидрогеназой, в то время как ацетат свободно проникает через гематоэнцефалический барьер [7]. Нельзя игнорировать и возможность интрацеребрального образования ацетата из этанола. Одним из возможных объяснений региональных особенностей в этанол-индуцированном увеличении концентрации ацетата у экспериментальных групп могут служить особенности функционирования у них церебральных этанол-метаболизирующих систем.

Уровень ацетил-КоА в гомогенатах коры мозга у короткоспящих крыс был меньше по сравнению с аналогичными регионами длительноспящих животных (таблица 2). Острое введение этанола увеличивало концентрацию ацетил-КоА в боковой коре короткоспящих животных, существенно не изменяя данный показатель у длительноспящих животных. При этом нивелируется разница в уровне ацетил-КоА в коре мозга экспериментальных групп, отмеченная на интактном уровне.

Окислительное декарбоксилирование пирувата в пируватдегидрогеназной реакции является источником ацетил-КоА в мозге. В связи с этим активность пируватдегидрогеназы прямо влияет на уровень ацетил-КоА, и обнаруженные различия в коре мозга экспериментальных групп в уровне этого кофермента могут быть обусловлены именно пируватдегидрогеназой. Нами обнаружено, что актив-

Таблица 2 – Концентрация ацетил-КоА (нмоль/гр ткани) в регионах мозга крыс с различной чувствительностью к наркотическому действию острого введения этанола (3,5 г/кг ин, ч/з 60 мин) (M ± ω, N=7)

Группа	Отдел мозга				
	Лобная кора	Боковая кора	Стриатум	Гипоталамус	Пр.мозг
ДС	83,3±18,7	83,3±17,2	68,2±19	51,3±6,3	46,4±11
КС	64,3±12,8*	60,7±8,98#*	60,3±8,2	57,8±6,7	57,1±12
ДС+Э	84,7±12,6	98,7±15,4	64,5±8	47,8±8	46,3±11
КС+Э	71,3 ± 7,9	86,4±17,2	56,8±8,5	40,7±20,1	50±11,6

Примечание: ДС – длительноспящие, КС – короткоспящие, +Э – крысы ч/з 60 минут после острого введения этанола (4,5 г/кг, ин), * – p < 0,05 в отношении длительноспящих, # – p < 0,05 в отношении с аналогичной группой + этанол.

ность этого фермента в коре головного мозга длительноспящих крыс, а также животных с генетически обусловленной высокой чувствительностью к этанолу (НАС) была выше по сравнению с аналогичным показателем для КС и LAS крыс. В то же время, крысы с низкой чувствительностью к этанолу (КС и LAS) характеризовались более высокой активностью ацетил-КоА синтетазы в коре мозга по сравнению с ДС и НАС животными.

Полученные нами результаты по взаимоотношению активностей пируватдегидрогеназы и ацетил-КоА синтетазы соответствуют теории «двууглеродного голода» у крыс, предпочитающих этанол в условиях свободного выбора, предложенную Островским Ю.М. [2].

Согласно этой теории, недостаток двууглеродных групп является одной из предпосылок предпочтительного отношения к этанолу, как дополнительному источнику ацетильных остатков и как следствие высокой мотивации. В такой ситуации низкая активность главного источника ацетил-КоА в мозге — пируватдегидрогеназы — вероятно, компенсируется более высокой активностью ацетил-КоА синтетазного пути. Реализация такого механизма компенсации, вероятно, полностью проявляется в условиях избыточного поступления этанола в организм. И действительно, имеющаяся на интактном уровне разница в концентрации ацетил-КоА в коре мозга у короткоспящих и длительноспящих животных полностью нивелировалась поступлением этанола (таблица 2).

На основании полученных результатов сделаны следующие **выводы**:

1. Короткоспящие животные характеризуются более высоким уровнем ацетата и более низким уровнем ацетил-КоА в коре мозга по сравнению с длительноспящими.

2. Острое введение этанола приводит к увеличению концентрации ацетата во всех структурах мозга как короткоспящих, так и длительноспящих животных. При этом разница между исследуемы-

Таблица 3 – Активность ферментов обмена ацетата и ацетил-КоА и ацетилхолина (нмоль/мин/мг белка) в коре головного мозга крыс, отличающихся по наркотическому эффекту этанола (M±ω)

Группа	N	Фермент	
		Пируватдегидрогеназа	Ацетил-КоА синтетазы
ДС	14	26,3 ± 1,4*	3,3 ± 0,2*
КС		18,8 ± 0,8	4,2 ± 0,2
НАС	10	28,5 ± 2,6 ⁺	2,8 ± 0,3 ⁺
LAS		20,7 ± 3,5	5,1 ± 0,6

Примечание: * – разница по отношению КС животных (p < 0,05), + – разница в отношении LAS животных (p < 0,05).

ми группами крыс в концентрации этой жирной кислоты в коре головного мозга сохранялась.

3. Острая нагрузка этанолом приводила к увеличению уровня ацетил-КоА у короткоспящих крыс и нивелированию межгрупповой разности в концентрации этого соединения в коре головного мозга.

4. Крысы с изначально низкой чувствительностью к этанолу характеризуются исходно низкой активностью синтеза ацетил-КоА по сравнению с высокочувствительными животными. В то же время, более высокая активность ацетил-КоА синтетазы и увеличение уровня ацетил-КоА в коре головного мозга короткоспящих крыс на фоне острой алкогольной нагрузки свидетельствует о потенциальной возможности супплементации пула ацетил-КоА из ацетата у этой группы животных, которая реализуется в условиях поступления этанола в организм.

Литература

1. Островский, Ю.М. Метаболическая концепция генеза алкоголизма / Ю.М. Островский // Этанол и обмен веществ / Ю.М. Островский [и др.]; под ред. Ю.В. Островского. — Минск: Наука и техника, 1982. — С. 6–41.
2. Островский, Ю.М., Сатановская, В.И., Садовник, М.Н. Генетическая детерминированность отношения к алкоголю / Ю.М. Островский, В.И. Сатановская, М.Н. Садовник // Биологический компонент в генезе алкоголизма. Ю.М. Островский, [и др.] — Минск: Наука и техника, 1986. — Гл. 1. — С. 6–16
3. Чумакова О.А. Холинэргическая система мозга в механизмах предпочтения и толерантности к этанолу: автореф. дис. канд. биол. наук: 03.00.04/ О.А. Чумакова Киевский гос. ун-т. — Киев, 1985. — 19 с
4. Browman, K. E., Crabbe, J.C. Alcohol and genetics: new animal models / K. E. Browman, J.C. Crabbe // Molecular medicine today — 1999 — Vol. 5. — P. 310–318
5. Brundege, J.M., Dunwiddie, T.V. The role of acetate as a potential mediator of the effects of ethanol in the brain / J.M. Brundege, T.V. Dunwiddie // Neurosci Lett. — 1995. — Vol. 186 — P. 214–218
6. Cloninger, C. Neurogenetic adaptive mechanisms in alcoholism / C. Cloninger // Scienc. — 1987. — Vol. 236 — P. 410–416
7. Dhopeswarkar, G.A., Subramanian, C., Mead, G.F. Rapid uptake of 1-14C-acetate by the adult rat brain 15 seconds after carotid injection / G.A. Dhopeswarkar, C. Subramanian, G.F. Mead // Biochim. Biophys. Acta. — 1971. — Vol. 248. — P. 41 — 47
8. Fadda, F., Rossetti, Z.L. Chronic ethanol consumption: from neuroadaptation to neurodegeneration / F. Fadda, Z.L. Rossetti // Prog. Neurobiol. — 1998. — Vol. 56, № 4. — P. 385 — 431
9. Faingold, C.L., N'Gouemo, P., Riaz, A. Ethanol and neurotransmitter interactions from molecular to integrative effects / C.L. Faingold, P. N'Gouemo, A. Riaz // Prog. Neurobiol.—1998—Vol. 55.—P. 509–535
10. Girela, E., Hernandez-Cueto, C., Calvo, M.D. Metabolism of acetate: experimental study / E. Girela, C. Hernandez-Cueto, M.D. Calvo // Rev. Esp. Fisiol. — 1993 — Vol. 49 — N 2 — P. 101–106
11. Kiselevski Y. Brain acetate metabolism in mechanisms of adaptation to ethanol / Y. Kiselevski, et al. // Med. Sci. Monit. — 2003. — Vol. 9. — N 5. — P. 178–182
12. Orrego H., Carmichael F., Israel Y. New insights on the mechanism of the alcohol-induced increase in portal blood flow / H. Orrego, F.Carmichael, Y. Israel // Can. J. Physiol. — 1988 — Vol.66—P. 1–9
13. Quraishi, S., Cook, R. M. Utilization of fatty acid in rumnants. Relative activities of acetyl CoA synthetase and acetyl CoA hydrolase in mitochondria and intracellular localization of acetyl CoA synthetase / S. Quraishi, R. M. Cook // J. Agr. And Food Chem. — 1972 — Vol. 20 — P. 91–95
14. Schuckit, M.A. Reaction to alcohol as predictor of alcoholism / M.A. Schuckit // Alcohol. Clin. Exp. Res. — 1992 — Vol. 16 — P. 656
15. Szutuwicz, A., Bielarczyk, H. Elimination of CoASH interference from acetyl-CoA cycling assay by maleic anhydride / A. Szutuwicz, H. Bielarczyk // Anal. Biochem. — 1987 — Vol. 164 — P. 292–29
16. Szutuwicz, A., Stepien, M., Piec, G. Determination of pyruvate dehydrogenase and acetyl-CoA synthetase activities using citratsynthetase / A. Szutuwicz, M. Stepien, G. Piec // Analyt. Biochem. — 1981. — Vol. 115. — P. 81 — 87
17. Waller. M.B. Initial sensitivity and acute tolerance to ethanol in the P and NP lines of rats / M.B. Waller, et al // Pharmacol. Biochem. Behav. — 1983 — Vol. 19 — P. 683–686.

Поступила 18.01.07