

УДК 616.89-008.441.13-092.9

# МОДУЛИРУЮЩИЙ ЭФФЕКТ АЦЕТАТА НА ЦЕНТРАЛЬНУЮ ХОЛИНЕРГИЧЕСКУЮ НЕЙРОТРАНСМИССИЮ В МЕХАНИЗМАХ ПРЕДРАСПОЛОЖЕННОСТИ К АЛКОГОЛИЗМУ

Ю.В. Киселевский<sup>1</sup>, к.б.н., доцент; Н.А. Оганесян<sup>1</sup>, к.м.н.;  
А. Шутович<sup>2</sup>, д.м.н., профессор; М. Томашевич<sup>2</sup>, к.м.н.

1 – Кафедра анестезиологии и реаниматологии с курсом клинической  
биохимии

УО «Гродненский государственный медицинский университет»

2 – Кафедра клинической биохимии  
Гданьская медицинская академия

Целью настоящего исследования было оценить эффект ацетата – прямого метаболита этанола – на холинергическую нейротрансмиссию коры головного мозга крыс с биологически детерминированной чувствительностью к наркотическому действию этанола.

Установлено, что ацетат увеличивает как базальный, так и кальций-стимулированный выброс ацетилхолина синапсосомами коры головного мозга крыс с изначально низкой чувствительностью к этанолу. В то же время, присутствие в инкубационной среде ацетата снижало кальций-стимулированный квантовый выброс ацетилхолина в синапсосомах коры головного мозга крыс с биологически обусловленной высокой чувствительностью к наркотическому эффекту этанола. Кроме того, показано, что ацетат приводит к значительному увеличению уровня внесинапсосомального аденозина.

Разнонаправленные эффекты ацетата на кальций-стимулированный квантовый выброс ацетилхолина в синапсосомах коры головного мозга крыс с различной чувствительностью к наркотическому эффекту этанола могут реализовываться через аденозиновый рецепторный аппарат и обусловлены более низкой плотностью A1 рецепторов на синапсах короткоспящих животных, по сравнению с длительноспящими крысами.

**Ключевые слова:** этанол, ацетилхолин, синапсосомы, головной мозг, ацетат, толерантность.

*This study was aimed at evaluating the effect of acetate, a direct metabolite of ethanol, on cholinergic neurotransmission of brain cortex in rats with biologically determined sensitivity to narcotic effect of ethanol.*

*It has been established that acetate tends to increase both basal and calcium-stimulated discharge of acetylcholine by synaptosomes of brain cortex in rats with initially low sensitivity to ethanol. At the same time the presence of acetate in incubation medium tended to reduce calcium-stimulated discharge of acetylcholine by synaptosomes of brain cortex in rats with biologically preconditioned high sensitivity to narcotic effect of ethanol. It has been also shown that acetate causes significant increase in level of extrasynaptosomal adenosine.*

*Different effects of acetate on calcium-stimulated discharge of acetylcholine by synaptosomes of brain cortex in rats with different sensitivity to narcotic effect of ethanol can be realized through adenosine receptor apparatus and preconditioned by much lower density of A1 receptors on synapses of short-sleeping animals as compared to the long-sleeping ones.*

**Key words:** ethanol, acetylcholine, synaptosomes, brain, acetate, tolerance.

## Введение

Достаточно давно было обнаружено, что животные гетерогенной популяции отличаются по чувствительности к острым эффектам этанола: время этанол-индуцированного сна, выраженность алкогольной атаксии, степень постэтанольной гипотермии. Ранее было показано, что в общей популяции крыс часть животных высокочувствительны (длительноспящие) к наркотическому действию этанола, часть имеют низкую чувствительность (короткоспящие). Эти животные также различаются по предпочтению этанола и функционированию ней-

ротрансмиттерных и нейромодуляторных систем [17]. Кроме того, данные группы различаются в скорости развития алкогольной зависимости в условиях принудительного введения этанола. Так, у животных, изначально низкочувствительных к действию этанола и предпочитающих этанол воде, в условиях свободного выбора симптомы алкогольной зависимости развиваются быстрее, по сравнению с группой низкочувствительных к этанолу крыс при хроническом введении этилового спирта [2, 10].

В связи с вышесказанным, изучение механиз-

мов биологически обусловленной различной чувствительности к эффектам этанола является важной задачей, решение которой поможет в разработке адекватных терапевтических подходов в предупреждении развития алкогольной болезни.

Целью настоящего исследования явилась оценка роли ацетата в модуляции центральной холинергической нейротрансмиссии в механизмах предрасположенности к развитию алкоголизма.

### 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.

Через 2 недели после тестирования крыс ДС и КС групп декапитировали, мозг немедленно извлекли и изолировали кору головного мозга.

Синаптосомальную фракцию из коры головного мозга крыс выделяли с использованием метода дифференциального центрифугирования в градиенте фикола и сахарозы. Синаптосомальную взвесь, содержащую 2,5-3 мг белка, инкубировали в течение 30 мин при 37°C в среде объемом 2 мл, содержащей 2,5 ммоль натриевой соли L-малата, пирувата и ацетата. Для моделирования состояния деполяризации к среде инкубации добавляли  $\text{CaCl}_2$  с таким расчетом, чтобы его конечная концентрация в среде была 1 ммоль. Концентрацию АХ определяли в депротенизированных образцах энзиматически [14]. Аденозин в инкубационной среде определяли люцинометрическим методом с применением люцеферин-люцеферазной реакции на люцинометре LKB Pharmacia [5]. Результаты выражали в виде среднего значения (М) и стандартного отклонения ( $\omega$ ). Достоверность различия между выборками оценивали с использованием t-критерия Стюдента. Различия рассматривались как статистически достоверные при уровне значимости  $p < 0,05$ .

### Результаты и обсуждение

Скорость синтеза ацетилхолина синаптосомами КС крыс была достоверно ниже, по сравнению с аналогичным показателем для ДС животных на 60% (таблица).

Как известно, процесс синтеза ацетилхолина зависит от трех параметров: доступности ацетильного остатка в виде ацетил-КоА, содержания холина и активности фермента ацетилхолинтрансфе-

**Таблица** – Эффект ацетата на квантовый выброс ацетилхолина из синапсом коры головного мозга крыс с различной биологически обусловленной устойчивостью к наркотическому действию этанола ( $M \pm \omega$ ,  $n=6$ )

Условия инкубации	Группа	
	КС	ДС
	Скорость синтеза ацетилхолина, пмоль/мин/мг белка	
2,5 ммоль Пируват + 2,5 ммоль Малат	6,2 ± 0,43	15,8 ± 1,62*
2,5 ммоль Пируват + 2,5 ммоль Малат + 1 ммоль $\text{Ca}^{+2}$	13,6 ± 2,4 #	25,3 ± 1,9*#
2,5 ммоль Пируват + 2,5 ммоль Малат + 2,5 мМ Ацетат	10,1 ± 2,3	13,4 ± 2,1
2,5 ммоль Пируват + 2,5 ммоль Малат + 2,5 ммоль Ацетат + 1 ммоль $\text{Ca}^{+2}$	20,95 ± 2,1 #	15,03 ± 1,1*
	Квантовый выход ацетилхолина, пмоль/мин/мг белка	
2,5 ммоль Пируват + 2,5 ммоль Малат + 2,5 ммоль Ацетат	10,8 ± 0,47	3,9 ± 1,3*

Примечание: \* - статистически значимая разница по отношению к КС группе, # - статистически значимая разница по отношению к животным аналогичной группы без добавления ионов кальция в среду.

разы. Дефицит хотя бы одного из трех компонентов этой системы под действием каких-либо патологических факторов приводит к развитию холинергической недостаточности. Ранее нами продемонстрировано отсутствие разницы в активности ацетилхолинтрансферазы в коре головного мозга крыс длительноспящих и короткоспящих крыс [1]. В то же время, нами показано, что крысы, малочувствительные к наркотическому действию этанола, отличаются более низкой активностью пируватдегидрогеназы в коре мозга, а также более низкой скоростью утилизации пирувата и более низким уровнем ацетил-КоА в синаптосомах коры головного мозга [1]. Данные факты позволяют считать, что синаптосомы КС животных обладают менее эффективной системой синтеза ацетил-КоА из пирувата и, как следствие этого, более низкой активностью синтеза ацетилхолина. Ионы кальция вызывали достоверное увеличение скорости выхода ацетилхолина из синаптосом как КС, так и ДС животных. Синаптосомы короткоспящих животных были более чувствительны к стимулирующему эффекту кальция на выброс ацетилхолина, по сравнению с ДС животными (таблица). Так, добавление ионов кальция к синаптосомам коры головного мозга короткоспящих крыс приводило к более чем двукратному (на 119%) росту выброса ацетилхолина, а у длительноспящих животных кальций-индуцированный рост выброса этого нейротрансмиттера составил 60% (таблица).

Присутствие в среде инкубации ацетата достоверно увеличивало скорость синтеза ацетилхолина синаптосомами короткоспящих крыс как на базальном уровне, так и в условиях деполяризации. В группе длительноспящих такого эффекта не выявлено. Стимулирующий эффект кальция на выб-

рос ацетилхолина в группе КС животных в присутствии ацетата был существенно выше (на 54%), чем без него. В свою очередь, у длительноспящих животных ацетат практически нивелировал стимулирующее влияние кальция на выброс ацетилхолина. Квантовый выброс ацетилхолина в присутствии ацетата оказался больше в группе КС крыс более чем в два раза по сравнению с ДС животными (таблица).

Регуляция холинергической трансмиссии осуществляется целым рядом систем, включающих как ауторегуляцию, так и эффекты других нейромедиаторов и нейромодуляторов. Одним из известных потенциальных модуляторов холинергической активности является аденозин и его рецепторный аппарат [8]. Причем, различные типы пуринергических рецепторов по-разному реализуют свои нейромодулирующие эффекты. Стимуляция  $A_1$ -рецепторов ингибирует, а  $A_2$ -рецепторов активирует холинергическую нейротрансмиссию [15]. Действие аденозина как ингибирующего нейромодулятора реализуется через  $A_1$ -рецепторы, локализованные на пресинаптической мембране. Данные рецепторы достаточно широко представлены на аксональных проекциях холинергических нейронов в коре головного мозга крыс [12].

Ранее показано, что ацетат увеличивает уровень аденозина в плазме крови, а также в различных тканях животного организма [3, 14]. Для оценки эффекта ацетата на уровень внесинапсосомального аденозина нервные окончания, выделенные из коры головного мозга крыс общей популяции, инкубировали в присутствии 2,5 ммоль ацетата, после чего оценивали уровень аденозина в инкубационной среде.

Нами продемонстрировано, что присутствие в инкубационной среде ацетата приводило более чем к двукратному увеличению высвобождения аденозина из нервных окончаний коры головного мозга экспериментальных животных (рисунок). При этом внутрисинапсосомальный уровень этого нуклеотида существенно не изменялся.

На основании полученных данных мы сделали вывод о том, что в наших экспериментальных условиях ацетат приводит к значительному увеличению концентрации внесинапсосомального аденозина. Данный факт объясняется по-разному различными авторами. Так, часть из них считает, что увеличение уровня аденозина в присутствии ацетата связано с ингибированием последним транспортных систем аденозина [12]. Другие объясняют этот факт увеличением продукции аденозина в процессе реакции активации ацетата в ацетил-КоА синтетазной реакции [3, 6, 13].

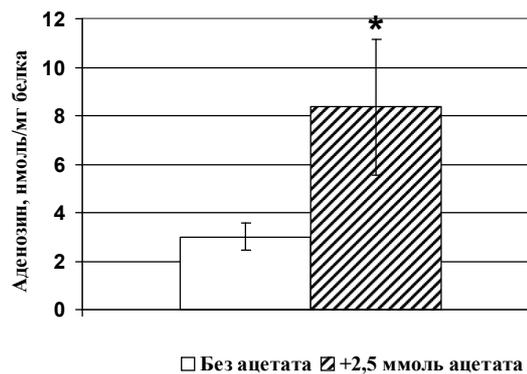


Рисунок – Эффект ацетата на внесинапсосомальный уровень аденозина.  
\* – статистическая разница по отношению к среде без ацетата

Учитывая вышесказанное, логично предположить, что добавление ацетата в среду инкубации синапсом из коры мозга приводит к росту уровня внесинапсосомального аденозина, который посредством модулирующего действия на  $A_1$ -рецепторы синапсом длительноспящих крыс приводит к ингибированию кальций-стимулированного выхода ацетилхолина. В то же время, ранее в работах ряда авторов показано, что поведенческие эффекты пуринов на организм мышей с генетически обусловленной продолжительностью этанолового сна различались между группами животных [7, 16]. Была выявлена меньшая чувствительность короткоспящих животных к агонистам пуриновых рецепторов. Причем, снижена была чувствительность в большей степени к агонистам  $A_1$ -рецепторов [4]. Исходя из этих данных, можно предположить, что отсутствие ингибирующего действия ацетата на квантовый выход ацетилхолина синапсом крыс с низкой чувствительностью к наркотическому действию этанола обусловлена более низкой чувствительностью  $A_1$ -рецепторов нервных окончаний, по сравнению с длительноспящими крысами [11].

На основании полученных результатов можно сделать следующие **выводы**:

1. Ацетат ингибирует активность холинергических синапсов коры головного мозга животных общей популяции. Данный эффект ацетата реализуется, вероятно, через пуринергическую нейромодуляторную систему. Так, ацетат приводит к увеличению уровня внесинапсосомального аденозина, который, в свою очередь, посредством активации пресинаптических пуринергических рецепторов  $A_1$  ингибирует квантовый выброс ацетилхолина синапсами коры головного мозга.

2. Биологически обусловленная устойчивость к наркотическому действию этанола сопровождается нивелированием ингибирующего эффекта аце-

тата на квантовый выброс ацетилхолина, что может быть обусловлено низкой плотностью A1 пуринергических рецепторов на пресинаптической мембране кортикальных синапсов животных, изначально устойчивых к гипнотическому эффекту этанола.

3. Компенсация низкой базальной активности систем биосинтеза ацетилхолина в кортикальных нервных окончаниях животных с биологически обусловленной устойчивостью к наркотическому действию этанола обеспечивается за счет увеличения чувствительности синаптосомальной системы выброса ацетилхолина к стимулирующему эффекту кальция, а также способностью нервных окончаний коры мозга эффективно использовать ацетильную группу ацетата для биосинтеза ацетилхолина, что имеет ключевое значение в условиях образования больших количеств ацетата, например, при алкоголизации.

#### Литература

1. Киселевский, Ю.В. Устойчивость к наркотическому действию этанола и синтез ацетилхолина в синаптосомах коры головного мозга крыс / Ю.В. Киселевский, Н.А. Оганесян // Журнал ГГМУ. – 2005. – № 1. – С 37-40.
2. Островский, Ю.М. Метаболическая концепция генеза алкоголизма / Островский Ю.М. // Этанол и обмен веществ / Ю.М. Островский [и др.]; под ред. Ю.В. Островского. – Минск: Наука и техника, 1982. – С. 6-41.
3. Actions of ethanol and acetate on rat cortical neurons: ethanol/adenosine interactions / Phillis J.W., et al // Alcohol. – 1992. – Vol. 9, № 6. – P. 541-546.
4. Behavioral sensitivity to PIA in selectively bred mice is related to a number of A1 adenosine receptors but not to cyclic AMP accumulation in brain slices / Fredholm B.B. [et al.] // Eur.J.Pharmacol. – 1985. – Vol. 111 – P. 133-136.
5. Chemiluminescent determination of adenosine, inosine and hypoxanthine/xanthine / H. Kather [et al.] // Anal Biochem. – 1987. – Vol. 163. – P. 187-206.
6. Cullen, N. Electrophysiological action of acetate, a metabolite of ethanol, on hippocampal dentate granule neurones: interaction with adenosine / N. Cullen, P.L. Carlen // Brain Res. – 1992. – Vol. 588. – P. 49-57.
7. Differential CNS sensitivity to PIA and theophylline in long-sleep and short-sleep mice / W.R. Proctor [et al.] // Alcohol – 1985 – Vol. 2. – P. 287-291.
8. Dunwiddie, T. V. Adenosine neuromodulation / T.V. Dunwiddie, B.B. Fredholm // Purinergic Approaches in Experimental Therapeutics / K. A. Jacobson, M. F. Jarvis (eds). – New York: Wiley Liss, 1997. – P. 359-382.
9. Dunwiddie, T. V. The role and regulation of adenosine in the central nervous system / T. V. Dunwiddie, S. A. Masino // Annu. Rev. Neurosci. – 2001. – Vol. 24. – P. 31-55.
10. Eriksson, C.J. Ethanol and acetaldehyde metabolism in rat strains genetically selected for their alcohol preference / C.J. Eriksson // Biochem. Pharmacol. – 1973. – Vol. 22 – P. 2283-2292.
11. Fredholm, B.B. Effects of ethanol and acetate on adenosine production in rat hippocampal slices / B.B. Fredholm, A. Wallman-Johanson // Pharmacol. Toxicol. – 1996. – Vol. 79. – P. 120-123.
12. Olah, M. E. Adenosine receptor subtypes: characterization and therapeutic regulation / M. E. Olah, G. L. Stiles // A. Rev. Pharmac. Toxicol. – 1995. – Vol. 35. – P. 581-606.
13. Puig, J.G. Ethanol – induced activation of adenosine nucleotide turnover. Evidence for a role of acetate / J.G. Puig, I.H. Fox // J.Clin.Invest. – 1984. – Vol. 74. – P. 936-941.
14. Ricny, J. Determination of acetylcholine and choline by flow-injection with immobilized enzymes and fluorimetric or luminometric detection / J. Ricny, J. Coupek, S. Tucek // Analyt. Biochem. – 1986. – Vol. 176 – P. 221-227.
15. Rockville, M.D. Eighth Special Report to the US Congress on Alcohol and Health / M.D. Rockville // US Department of Health and Human Services // Shalala DE (Ed.). – New York: Wiley Liss. – 1993. – P. 218-238.
16. Smolen, T.N. Purinergic modulation of ethanol-induced sleep time in long-sleep and short-sleep mice / T.N. Smolen, A. Smolen // Alcohol. – 1991. – Vol. 8, N 2. – P. 123-130.
17. Tabacoff, B. Commentary on ethanol tolerance. / B. Tabacoff, C. Melhior, P. Hoffman // Alcoholism: Clin. Exp. Res. – 1982 – Vol. 6 – P. 583-587.

Поступила 05.06.08