

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

УДК: 577.151.121:616.092.9

© Л.Р. Бардина

МЕТАБОЛИЧЕСКАЯ АДАПТАЦИЯ К АЛКОГОЛЮ У КРЫС, РАЗЛИЧАЮЩИХСЯ ПО ПРЕДПОЧТЕНИЮ ЭТАНОЛА ВОДЕ.

Л.Р.БАРДИНА, В.И.САТАНОВСКАЯ

Институт биохимии НАНБ, 230017 Беларусь, Гродно, БЛК 50. Факс: (0152) 33-41-21.

Последние исследования указывают на то, что феномен предпочтения этанола животными и предрасположенность к потреблению алкоголя у людей могут быть связаны с интенсивностью его обмена в организме и зависеть от активности ферментных систем метаболизма спиртов и альдегидов, являющихся мощными регуляторами уровня ацетальдегида в клетке. В работе рассмотрены особенности приспособительных реакций этих систем (алкогольдегидрогеназа, микросомальная этанол-окисляющая система, каталаза, альдегиддегидрогеназа) в условиях длительного контакта с алкоголем у крыс, различающихся по предпочтению воды или растворов этанола (5%, 10%, 15%).

Ключевые слова: алкогольдегидрогеназа, альдегиддегидрогеназа, микросомальная этанол-окисляющая система, каталаза, этанол.

ВВЕДЕНИЕ. В последние десятилетия исследования взаимосвязи между активностью ферментных систем обмена этанола и уровнем алкогольной мотивации у животных проводились довольно интенсивно. Были выявлены различия в предпочтении алкоголя у инбредных линий животных в ситуации, когда им позволяли выбирать между водой и алкоголем [1,2], и показано, что высокая скорость элиминации этанола является признаком, (вероятно, генетически опосредованным), который обуславливает последующее формирование алкогольной мотивации, [3,4]. Все эти исследования указывают на то, что феномен предпочтения этанола животными и предрасположенность к потреблению алкоголя у людей могут быть связаны с интенсивностью его обмена в организме и ферментные системы метаболизма этанола играют не последнюю роль в механизмах формирования влечения к алкоголю.

Большое значение в проявлении поведенческих эффектов этанола придает его метаболиту - ацетальдегиду - как психофармакологическому агенту. Изучено подкрепляющее действие ацетальдегида, его способность вызывать положительное эмоциональное состояние - эйфорию, лежащую в основе патологического влечения к алкоголю [5]. Предполагают, что механизм этого влечения связан с локальным уровнем ацетальдегида в мозге, возникающим при употреблении алкоголя и зависящим от активности систем метаболизма этанола и ацетальдегида печени и мозга [6]. В этой связи представляется актуальным исследование процессов адаптации систем, окисляющих экзогенный этанол (каталаза, микросомальная этанол-окисляющая система, алкогольдегидрогеназа) и являющихся мощными

регуляторами уровня ацетальдегида в клетке у животных, различающихся по предпочтению к алкоголю.

Ранее нами показано, что крысы, отобранные по признаку предпочтения 5% этанола или воды, отличаются скоростью обмена этанола, ацетальдегида и других двууглеродных соединений, а также направленностью формирования метаболической адаптации систем обмена альдегидов при длительном контакте этих животных с алкоголем [7]. Кроме того, животные гетерогенной популяции, предпочитающие 10% и 15% этанол, отличаются от особей, отобранных в условиях выбора между 5% этанолом и водой. Поэтому, целью настоящего исследования явилось изучение особенностей приспособительных реакций систем обмена спиртов и альдегидов в условиях длительного контакта с алкоголем у крыс, оттестированных нарастающими по концентрации растворами этанола.

МЕТОДИКА. Белых крыс-самцов гетерогенной популяции массой 160-190 г. помещали в индивидуальные клетки. Животных содержали в условиях обычного питания и свободного выбора в отношении источника питья (воды или раствора этанола) тестировали трижды с интервалом в 1 неделю, используя различные концентрации раствора этанола (5%, 10%, 15%). Затем животные в течение 1 месяца потребляли только 15% раствор этанола, поскольку эта концентрация является оптимальной для создания модели хронического алкоголизма и при минимальных затратах времени позволяет добиться добровольного потребления животными максимально больших доз алкоголя, при которых он эффективнее всего оказывает токсическое действие на функцию их органов и систем [8, 9]. Через 1 месяц потребления 15% раствора этанола и 17 дней отмены животных повторно тестировали на предпочтение воды или этанола (5%, 10%, 15% растворов) и через неделю после последнего контакта с алкоголем крыс декапитировали.

Микросомальную фракцию выделяли Ca^{2+} -агрегационным методом [10]. Очистку пероксисом проводили методом центрифугирования обогащенной этими частицами λ -фракции в многоступенчатом градиенте концентрации сахарозы [11]. Пероксидазную активность каталазы определяли по методу Handler et al. [12], алкогольдегидрогеназы (АДГ) - Nakajima et al. [13], микросомальной этанол-окисляющей системы (МЭОС) - Lieber and De Carli [14], альдегиддегидрогеназ (АльДГ) - Tottmar et al. [15]. Содержание белка определяли по методу Lowry et al. [16]. Статистическую обработку данных проводили, используя t-критерий Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ. Первое тестирование на предпочтение этанола или воды показало, что с увеличением концентрации алкоголя количество животных, отвергающих этанол в процентном соотношении возрастало в 6 раз, а предпочитающих этанол (ПЭ) животных - уменьшалось в 3 раза, т. е. с увеличением концентрации этанола с 5% до 15% усиливался аверсивный эффект алкоголя (рис.1). Через месяц алкоголизации при повторном тестировании выявлено, что количество предпочитающих воду (ПВ) животных в тесте с 5% и 10% растворами этанола увеличилось в 2 раза, в основном, за счет крыс промежуточной группы (ПГ), а у животных с выраженным начальным влечением к алкоголю, напротив, при длительной принудительной алкоголизации аверсивный эффект не проявлялся. Более того, при использовании 15% раствора этанола количество ПВ животных снижалось на 20%, а ПЭ - повышалось на 10%, что, возможно, объясняется разрушением оро-сенсорного различия крепости напитков. Около 40% животных, изначально предпочитающих воду, через месяц алкогольной интоксикации сохранили предпочтение воды, крысы, изначально предпочитающие этанол, в среднем, на 50% остались предпочитающими, а из животных, отнесенных в промежуточную группу только 20% осталось в этой группе, что является на наш взгляд отражением гетерогенности исследуемой популяции.

Таким образом, через месяц алкоголизации 15%-м раствором этанола были определены группы животных с окончательно сформировавшейся алкогольной мотивацией и выявлено, что устойчивость признака предпочтения 5% этанола у

крыс (группа ПЭ₁→ПЭ₂) характеризуется повышенной пероксидазной активностью каталазы печени по сравнению с активностью каталазы печени крыс с усиленной аверсией (группа ПЭ₁→ПВ₂, рис.2). По активности МЭОС, АДГ (с этанолом и ацетальдегидом в качестве субстратов) группы животных достоверно не различались (Табл. 1).

Таблица 1. Активность микросомальной этанол-окисляющей системы (нмоль НАДФН/мин мг белка) и алкогольдегидрогеназы (нмоль НАДН/мин мг белка) в печени крыс, различающихся по предпочтению воды или 5% этанола.

показатель / группа животных	ПЭ ₁ → ПВ ₂ (n=4)	ПЭ ₁ → ПЭ ₂ (n=9)	ПЭ ₁ → ПГ ₂ (n=7)
МЭОС	6,84 ± 0,48	10,26 ± 2,71	8,43 ± 1,03
АДГ-Э	7,55 ± 0,82	7,33 ± 0,96	6,35 ± 0,65
АДГ-АА	24,99 ± 5,38	22,95 ± 3,39	21,07 ± 1,45

В скобках количество животных в каждой группе

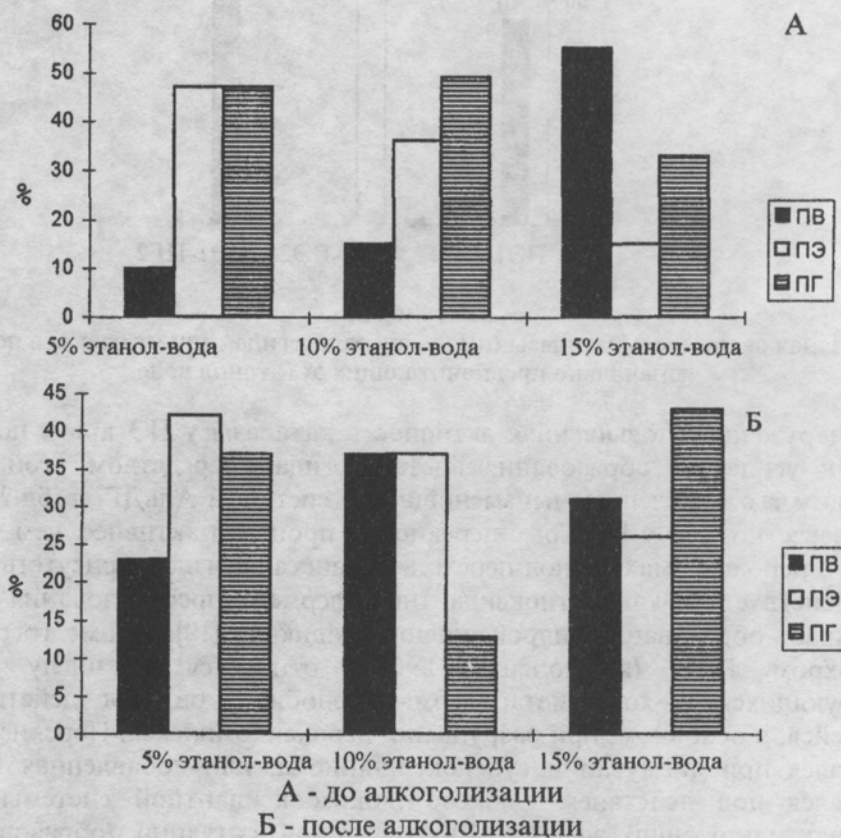


Рисунок 1.

Процентное соотношение количества животных, предпочитающих воду (ПВ), предпочитающих этанол (ПЭ) и промежуточной группы (ПГ) до алкоголизации (А) и после 1-месячной алкоголизации 15% раствором этанола (Б).

В экспериментах, проведенных нами на животных, различающихся по чувствительности к гипнотическим эффектам этанола, отмечалась только изначальная разница в активности каталазы печени у коротко- и долгоспящих крыс: более высокая пероксидазная активность этого фермента наблюдалась у короткоспящих крыс [17]. Принудительная алкоголизация этих животных приводила к исчезновению различий в активности каталазы и к активации МЭОС, т.е.

наблюдалась метаболическая адаптация, которая характеризуется увеличением вклада МЭОС в обмен этанола.

Таблица 2. Активность альдегиддегидрогеназ (нмоль НАД(Ф)Н/ мин мг белка) в печени крыс, различающихся по предпочтению воды или 5% этанола.

Фермент группа животных	ПЭ ₁ → ПВ ₂ n=4	ПЭ ₁ → ПЭ ₂ n=9	ПЭ ₁ → ПГ ₂ n=7
МИТОХОНДРИИ			
НАДН- АльДГ . с низкой Км	1,77 ± 0,84	1,04 ± 0,52	1,35 ± 0,74
НАДН- АльДГ. с высокой Км	7,12 ± 0,74	7,51 ± 0,82	8,26 ± 0,77
НАДФН- АльДГ	1,05 ± 0,47	0,60 ± 0,4	1,20 ± 0,43
МИКРОСОМЫ			
НАДН- АльДГ	10,95 ± 1,78	11,12 ± 2,13	13,56 ± 1,15
НАДФН- АльДГ	1,00 ± 1,00	1,47 ± 0,68	1,85 ± 0,74

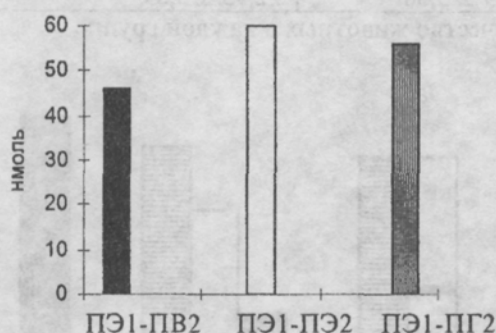


Рисунок 2.

Пероксидазная активность каталазы (нмоль ацетальдегида/ мин мг белка) в печени крыс, изначально предпочитающих 5% этанол воде.

Обнаруженная повышенная активность каталазы у ПЭ крыс, по-видимому, приводит к усилению образования ацетальдегида посредством этой системы с последующим его окислением неизменившейся системой АльДГ (табл.2). С другой стороны, известно, что у ПЭ крыс перекисные процессы активнее, чем у ПВ [18], а поскольку в пероксисомах этанол переходит в ацетальдегид в присутствии H_2O_2 , то каталаза действует и как антиоксидантный фермент преобразования перекиси и предотвращает образование гидроксильного радикала [19]. Кроме того, показано, что цитохром Р450 (компонент МЭОС) относится к числу ферментов, инактивирующихся в ходе метаболизма ксенобиотиков под действием H_2O_2 , образующейся, в основном, при разрушении пероксикомплекса. Перекись водорода, образующаяся при дисмутации супероксид-аниона, или добавленная извне, либо образующаяся под действием глюкозо-глюкозооксидантной системы оказывает слабый инактивирующий эффект [20]. В данной ситуации (образование H_2O_2) повышение активности каталазы имеет протекторное действие на цитохром Р450. Действительно, установлено, что в присутствии ингибиторов каталазы - азида натрия и гидроксиламина - скорость инактивации цитохрома Р450 повышается [21].

В ранее опубликованных работах различия в предпочтении животными этанола пытались обосновать неодинаковой активностью АДГ и АльДГ печени. Бородин с соавторами отмечали, что у генетических линий животных с выраженной склонностью к потреблению алкоголя, активность АДГ и АльДГ выше, чем у линий, отвергающих алкоголь [4], т.е. у ПЭ крыс создаются наиболее благоприятные условия для окисления ацетальдегида в ацетат вследствие высокой активности этих ферментов, и реализуется механизм, препятствующий переходу ацетальдегида из печени в ток крови и проявлению его токсических эффектов, в частности на ЦНС, что, возможно, и является одним из факторов, обуславливающих

предпочтение этанола. Предполагают, что именно соотношение АДГ/АльДГ определяет эффективность утилизации алкоголя в печени, концентрацию в крови и тканях этанола и ацетальдегида, в конечном счете, влияя на уровень потребления этанола через соотношение подкрепляющих и аверсивных эффектов этих соединений. Эта точка зрения подтверждается при исследовании влияния ингибитора АДГ пиразола на потребление этанола у линейных крыс с низким и высоким уровнем потребления [22].

У исследуемых нами животных отличия в активности АДГ проявились только в группе крыс, предварительно оттестированных на предпочтение воды или 15% этанола. Выявлено, что по активности каталазы и МЭОС эти животные достоверно не различались, однако выработка алкогольной мотивации у крыс, изначально отвергавших 15% этанол, характеризовалась повышенной редуктазной активностью алкогольдегидрогеназы (рис.3), что, возможно, является одним из путей детоксикации ацетальдегида, т.е. перевод его в менее токсичное соединение - этанол.

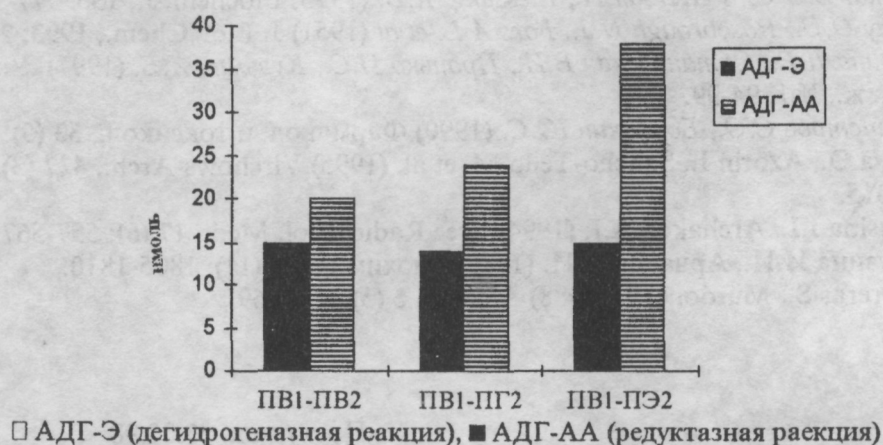


Рисунок 3.
Активность алкогольдегидрогеназы (нмоль НАДН /мин мг белка) в печени крыс, изначально предпочитающих воду.

Таким образом, в результате исследования динамики изменения признаков предпочтения у крыс до и после алкоголизации и определения активности этанол-метаболизирующих систем печени, у животных, отличающихся по предпочтению алкоголя, выявляются различные пути адаптации к его длительному введению. Так, крысы, предпочитающие 5% этанол воде характеризуются повышенной пероксидазной активностью каталазы печени, что может быть проявлением гомеостатических механизмов, направленных на сохранение признаков предпочтения, но там, где признаки изменяются, активация каталазы не наблюдается. У ПВ животных процесс адаптации к длительному введению алкоголя сопровождается повышением редуктазной активности АДГ.

ЛИТЕРАТУРА.

1. Власова Н.В., Родионов А.П. (1988) Фармакокинетика этанола и предрасположенность животных к добровольной алкоголизации. М.: 118-123.
2. Sinclair J.P., Le A.D., Kiiianmaa K. (1989) *Experientia*, **45** (9): 798-805.
3. Власова Н.В., Родионов А.П. (1987) Бюлл. exper. биол. мед., **184** (7): 57-59.
4. Бородин Ю.С., Усатенко М.С., Петрова М.А. (1988) Фармакология - клиника. Сборник научных трудов под ред. Ю.С. Бородина: 44-45.
5. Зиматкин С.М. (1993) Эксперим. и клин. фармакология, **56** (2): 69-71.
6. Hunt W.A. (1996) *Alcohol*, **13** (2): 147-151.

7. Островский Ю.М., Сатановская В.И., Островский С.Ю. и др. (1988) Метаболические предпосылки и последствия потребления алкоголя, Мн. Наука и техника.
8. Буров Ю.В., Жуков В.Н. (1979) Хим.-фарм. журнал. 5: 42-50.
9. Буров Ю.В., Ведерникова Н.Н. (1985) Нейрохимия и фармакология алкоголизма, М. Медицина.
10. Litterst C.Z., Mimnaugh E.G., Reagan R.Z., Gram T.E. (1975) Life Sci., 17 (5): 813-818.
11. Антоненков В.Д., Сальников Д.А., Панченко Л.Ф. (1982) Вопр. мед. химии, №1, 71-77.
12. Handler J.A., Bradford B.U., Glassman E. et al. (1986) Biochem. Pharmacol., 35 (24): 4487-4492.
13. Nakajima M., Kato J., Kohgo Y. et al (1993) Alcohol and Alcoholism, 28 (S1B), 105-108.
14. Lieber C.S., De Carli Z. M. (1970) J. Biol. Chem., 245: 2502-2512.
15. Tottmar S.O.C., Petterson H., Kiessling K.U. (1973) Biochem. J., 135: 577-586.
16. Lowry O.U., Rosebrough N.J., Fors A.L. et al (1951) J. Biol. Chem., 193: 265-275.
17. Бардина Л.Р., Сатановская В.И., Пронько П.С., Кузьмич А.Б. (1997) Укр. биох. ж., №1, 94-99.
18. Бурмистров С.О., Бородин Ю.С. (1990) Фармакол. и токсикол., 53 (5): 59-60.
19. Tolosa O., Azorin I., Sancho-Tello M. et al. (1995) Virchows-Arch., 427 (3): 309-315.
20. Karusina I.I., Archakov A.I. (1994) Free Radic. Biol. Med., 17 (6): 557-567.
21. Карузина И.И., Арчаков А.И. (1985) Биохимия, 50 (11): 1805-1810.
22. Contreras S., Mardones J. (1988) Alcohol, 5 (5): 367-369.

Поступила 23.03.98

METABOLIC ALCOHOL ADAPTATION IN RATS WITH DIFFERENT PREFERENCE OF ETHANOL OVER WATER.

L.R.BARDINA, V.I.SATANOVSKAYA

Institute of Biochemistry, BLK 50, Grodno, Belarus, 230017. Fax: (0152) 33-41-21.

Recent studies have shown that the phenomenon of ethanol preference by animals and of alcohol consumption by humans may be related to the intensity of its metabolism in the body and depend on the activities of the ethanol and aldehyde metabolizing systems which are potential regulators of the acetaldehyde level in the cell. The special features of adaptative reactions of this system (alcohol dehydrogenase, microsomal ethanol oxidizing system, catalase, aldehyde dehydrogenase) were examined in rats, differing by the preference to water or ethanol (5%, 10%, 15%) under condition of a long contact with alcohol.

Key words: alcohol dehydrogenase, aldehyde dehydrogenase, microsomal ethanol oxidizing system, catalase, ethanol.