

Н. К. Харченко, В. М. Синицький

Деякі фізіологічні та біохімічні показники схильності щурів до вживання алкоголю

Изучалась активность альдегиддегидрогеназы (АЛДГ), алкогольдегидрогеназы (АДГ) цитоплазматических фракций структур мозга (гипоталамуса, среднего мозга, новой коры) в сыворотке крови, а также содержание дофамина (ДА) и норадреналина (НА) в указанных структурах и крови крыс, предпочитающих и отвергающих этанол. Выявлены изоформы АЛДГ и их активность у крыс, предпочитающих этанол, выше, чем у крыс, отвергающих его. Крысы не различаются по активности АДГ. Показано, что у крыс, предпочитающих этанол, понижено содержание НА и повышена концентрация ДА в ряде структур мозга и крови по сравнению с показателями крыс, отвергающих алкоголь.

Вступ

Серед причин, які сприяють розвитку алкоголізму, істотна роль належить спадковому нахилу до вживання алкоголю [3, 12, 13, 18]. Цим пояснюється інтерес до вивчення біологічних маркерів і факторів ризику, що дозволило б прогнозувати ймовірність розвитку алкоголізму [12, 13]. Одним з найважливіших питань є виявлення специфічного співвідношення активності ферментів обміну етанолу (Е) — алкогольдегідрогенази (АДГ) та альдегіддегідрогенази (АЛДГ) [3, 5, 6, 13]. Це пов'язано з обміном ацетальдегіду (АцА), який на думку деяких авторів [2, 4, 11, 14, 15] може відігравати важливу роль у розвитку алкоголізму. Особливу увагу дослідників привертає також функціональний стан центральних систем нейромедіаторів та їх роль у формуванні потягу до алкоголю [1, 3, 7]. Проте біологічні механізми схильності до вживання алкоголю вивчені недостатньо.

Метою нашого дослідження було вивчення активності АДГ та АЛДГ у цитоплазматичних фракціях відділів мозку (гіпоталамуса, середнього мозку, нової кори) та в сироватці крові, а також вміст дофаміну (ДА) і норадреналіну (НА) в указаних відділах мозку та крові щурів з різним відношенням до алкоголю.

Методика

Досліди проводили на білих безпородних щурах-самцях віком від 8 до 12 міс і масою 180-230 г. Щурів заздалегідь тестували на схильність до вживання алкоголю [3]. Для цього тварин поміщали в окремі клітки з наданням їм свободи вибору між 15 %-м розчином Е та води. Проводили реєстрацію щодобового споживання Е (1 г на 1 кг маси тіла). Стабільний рівень вживання Е встановлювався через два тижні. До I групи щурів, які надавали перевагу Е, віднесли тварин, котрі вживали не менше ніж 3 г Е на 1 кг маси тіла, а до II групи — щурів з відразою до алкоголю, які вживали до 2 г Е на 1 кг маси

© Н. К. Харченко, В. М. Синицький

тіла. Тварин, які мали помірно виражену схильність до алкоголю, віднесли до III групи. В дослідях використовували тварини I і II груп через місяць після тестування. Щурів декапітували, діставався мозок, а потім відділи мозку: гіпоталамус, середній мозок та нову кору. Всі операції проводили при 0 ± 4 °C. У цитоплазматичних фракціях відділів мозку визначали активність АДГ [19]. Вміст білка вивчали за методом Лоурі [14]. Кінетичні константи розраховували за методом Корніш-Бодена [9]. Ізоформи АЛДГ цитозольних фракцій структур мозку та сироватки крові позначали АЛДГ-1, АЛДГ-2 і АЛДГ-3 відповідно, що відповідає збільшенню концентрації АцА, при якій вони проявляють свою максимальну активність. Вміст ДА та НА у відділах мозку визначали за методом Когана та Нечаєва [8]. Результати дослідів оброблені статистично з використанням критерію t Стьюдента.

Результати та їх обговорення

У першій серії дослідів з тестування щурів на схильність до вживання алкоголю встановлено, що щурів із вираженою схильністю до вживання Е (I група) було близько 30 % всієї популяції. Щурів II групи (абстинентів) було 40 % від числа всієї популяції щурів. У інших тварин (проміжна III група) схильність до вживання алкоголю була помірно вираженою. Ці результати узгоджуються з даними літератури [3]. У наступній серії проводилося дослідження активності АЛДГ та АДГ у сироватці крові та у цитоплазматичних фракціях відділів мозку щурів I і II груп. При вивченні залежності активності АЛДГ сироватки крові щурів від концентрації АцА виявлена активність АЛДГ у щурів I і II груп при концентрації АцА близько 0,03 ммоль/л, а потім – її підвищення при збільшенні концентрації АцА від 0,03 до 0,06 ммоль/л, після чого крива – переходить у плато (рис. 1). При концентрації АцА від 0,5 до 1 ммоль/л активність АЛДГ знову підвищується, а потім стабілізується. Подальше підвищення концентрації субстрату від 1 до 5 ммоль/л не впливає на активність АЛДГ.

Оптимальне значення виявлення альдегіддегідрогеназної активності сироватки крові щурів I і II груп суттєво не відрізняється і в Na^+ , K^+ -фосфатному буфері відповідає значенням рН 7,6-7,8.

Отримані результати свідчать про наявність у сироватці крові щурів ізоформ АЛДГ з різною спорідненістю до АцА. Оптимальна концентрація АцА для виявлення активності АЛДГ відповідає значенню 0,06 ммоль/л для ізофермента з високою спорідненістю до АцА (позначимо її АЛДГ-2) і 1 ммоль/л – для ізофермента з низькою спорідненістю до АцА (позначимо її АЛДГ-3). Оскільки при низьких концентраціях АцА активністю АЛДГ-3 можна знехтувати, розраховані кінетичні характеристики для двох субстратів реакції (АцА та НАД), яка каталізується АЛДГ-2, у I і II груп. Значення K_m для НАД при різних концентраціях АцА в обох групах тварин однакові. В той же час значення K_m для АцА значно відрізняються у щурів I і II груп, що свідчить про наявність у сироватці крові цих щурів ізоформ з різною спорідненістю до АцА. У щурів I групи значення K_m для АцА значно нижче, ніж у тварин II групи. Тобто, АЛДГ-2 сироватки крові щурів I групи на відміну від АЛДГ-2 щурів II групи має більш високу спорідненість до АцА, що повинно сприяти прискореному обміну АцА у щурів I групи (табл. 1).

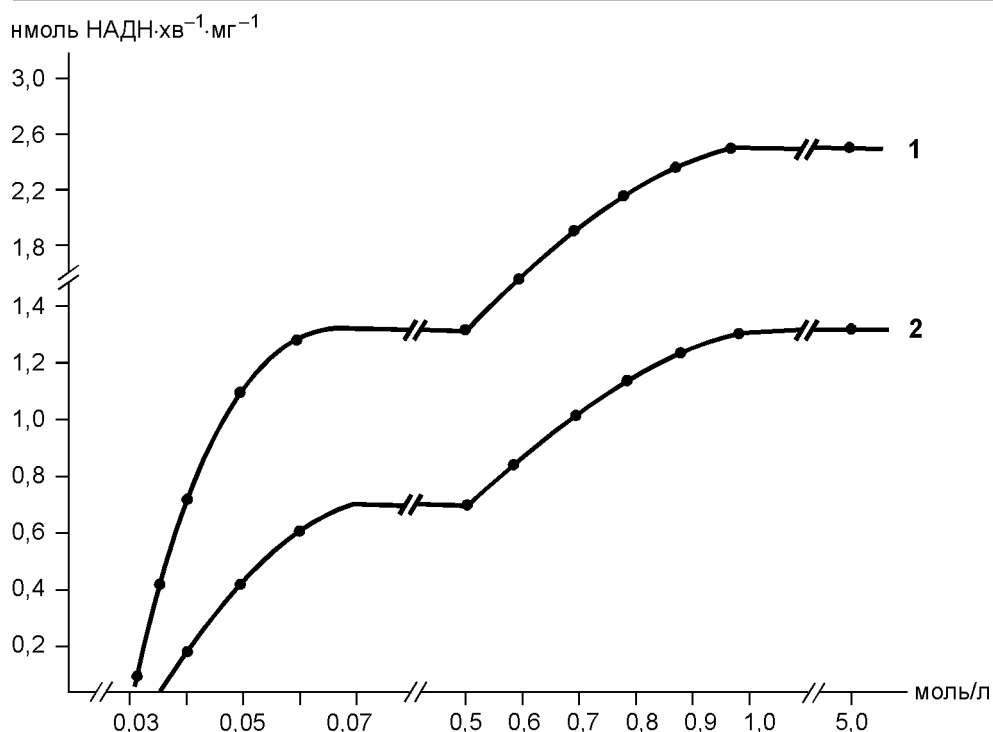


Рис. 1. Залежність швидкості реакції альдегіддегідрогенази від концентрації ацетальдегіду у сироватці крові щурів з вираженою схильністю до алкоголю (1) і з відразою до нього (2).

Активність АЛДГ та її підвищення при збільшенні концентрації АцА від 0,005 до 0,02 ммоль/л виявлена в цитоплазматичних фракціях усіх досліджуваних структур мозку щурів I групи, а також гіпоталамуса та середнього мозку щурів II групи (рис. 2). Підвищення концентрації АцА від 0,02 до 0,04 ммоль/л не впливає на активність АЛДГ. При подальшому підвищенні

Таблиця 1. Активність альдегіддегідрогенази (АЛДГ, нмоль НАД·хв⁻¹·мг⁻¹ білка та значення К_м (ммоль/л) для АЛДГ-2 сироватки крові щурів (M±m)

Показник	I група	II група
АЛДГ-2		
Активність АЛДГ (V _{max})	1,30 ± 0,10	0,65 ± 0,01
К _м		
АцА	38,0 ± 2,0	50,0 ± 1,0
НАД	1,20 ± 0,1	47,0 ± 3,0
АЛДГ-3		
Активність АЛДГ (V _{max})	1,20 ± 0,1	0,65 ± 0,01

Примітка. Активність АЛДГ-3 розрахована за різницею між значеннями активності при концентрації АцА 1 і 0,06 ммоль/л. Тут і в табл. 2-4 * P<0,01-0,001 – достовірність показників у I і II групах тварин.

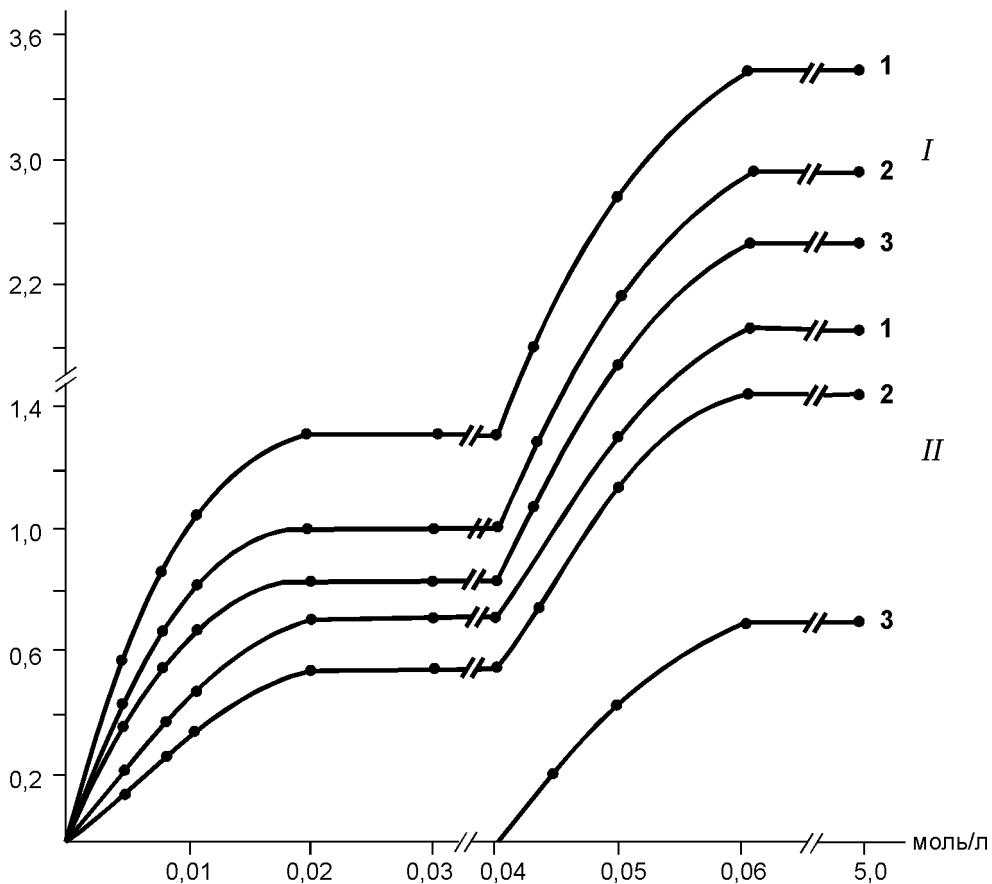
нмоль НАДН·хв⁻¹·мг⁻¹

Рис. 2. Вплив концентрації ацетальдегіду на активність альдегіддегідрогенази у цитоплазматичних фракціях відділів мозку (гіпоталамуса — 1, середнього мозку — 2, нової кори — 3) у щурів з вираженою схильністю до алкоголю (I) та з відразою до нього (II).

концентрації субстрату активність АЛДГ виявляється в усіх досліджуваних цитоплазматичних фракціях мозку щурів I і II груп. При концентрації АцА від 0,04 до 0,06 ммоль/л вона збільшується, після чого набуває характер плато. Підвищення концентрації АцА від 0,06 до 5 ммоль/л не впливає на ферментативну активність. Оптимальне значення рН для виявлення активності АЛДГ усіх досліджуваних цитоплазматичних фракцій відділів мозку істотно не відрізняється у щурів I і II груп і знаходиться в межах 7,6–7,9 в Na^+ , K^+ -фосфатному буфері.

Отже, в цитоплазматичних фракціях усіх досліджуваних відділів мозку щурів, що надають перевагу Е, виявлено дві ізоформи АЛДГ (позначимо їх АЛДГ-1 та АЛДГ-2), які проявляють максимальну активність при концентраціях АцА 0,02 та 0,06 ммоль/л відповідно. У щурів II групи АЛДГ-1 виявлена лише в гіпоталамусі та середньому мозку, в той час АЛДГ-2 — виявляється у них у всіх досліджуваних відділах мозку. Визначені кінетичні

характеристики для двох субстратів реакції (АцА та НАД), яка каталізується АЛДГ-1 (табл. 2). Значення K_m для НАД при різних концентраціях АцА практично не відрізняється у щурів з різним відношенням до Е. Значення K_m для АцА у щурів I групи значно нижчі, ніж у щурів II групи, що повинно сприяти більш швидкому обміну АцА у щурів I групи.

За активністю АДГ сироватки крові та цитоплазматичних фракцій структур мозку щури I і II груп не відрізняються між собою (табл. 3).

При визначенні вмісту катехоламінів у відділах мозку та крові щурів з різним відношенням до Е виявлено, що щури I групи відрізняються від щурів II групи зниженим вмістом НА в гіпоталамусі, середньому мозку, новій корі та крові і підвищеним вмістом ДА в гіпоталамусі, новій корі та крові (табл. 4).

Отже, щури I і II груп не відрізняються за швидкістю метаболізму Е в цитоплазматичних фракціях гіпоталамуса, середньому мозку, нової кори та в сироватці крові. В той же час вони відрізняються за швидкістю метаболізму АцА, яка в цитоплазматичних фракціях структур мозку щурів I групи значно вища, ніж у щурів II групи. Щури з різним відношенням до Е суттєво відрізняються також за вмістом катехоламінів у деяких структурах мозку.

Таблиця 2. Активність альдегіддегідрогенази (АЛДГ, нмоль НАДН·хв⁻¹·мг⁻¹ білка) та значення K_m (мкмоль/л) для АЛДГ-1 цитоплазматичних фракцій відділів мозку у щурів ($M \pm m$)

Показник	Цитоплазматичні фракції відділів мозку					
	гіпоталамуса	середнього мозку	нової кори	гіпоталамуса	середнього мозку	нової кори
	I група			II група		
АЛДГ-1						
Активність АЛДГ (V_{max})	1,02±0,10	1,31±0,12	0,82±0,01	0,56±0,02*	0,72±0,01*	—
K_m						
АцА	4,90±0,95	5,0±1,0	5,30±1,2	9,0±1,0*	8,5±0,9*	—
НАД	49,0±5,0	52,0±4,0	55,0±2,0	53,0±4,0	48,0±2,5	—
АЛДГ-2						
Активність АЛДГ (V_{max})	1,98±0,11	2,2±0,13	1,63±0,12	1,01±0,19*	1,30±0,29*	0,78±0,017*

Таблиця 3. Активність алкогольдегідрогенази (АДГ, нмоль НАД·хв⁻¹·мг⁻¹ білка) в цитоплазматичних фракціях відділів мозку та сироватці крові щурів ($M \pm m$)

Фермент	I група (n = 30)	II група (n = 34)
АДГ		
у сироватці крові	0,13±0,01	0,10±0,01
у цитоплазматичних фракціях:		
гіпоталамуса	0,06±0,01	0,05±0,01
середнього мозку	0,14±0,02	0,13±0,02
нової кори	0,15±0,02	0,13±0,02

Таблиця 4. Вміст катехоламінів у крові та відділах мозку щурів (M±m)

Катехоламіни	I група (n = 14)	II група (n = 12)
Норадреналін		
у крові, мкг/л	1,98±0,2	2,40±0,14*
у гіпоталамусі, мкг/г	0,22±0,02	0,49±0,01*
у середньому мозку, мкг/г	0,03±0,01	0,06±0,01*
у новій корі, мкг/г	0,02±0,01	0,04±0,01*
Дофамін		
у крові, мкг/л	0,14±0,01	0,07±0,01*
у гіпоталамусі, мкг/г	2,90±0,16	0,84±0,04*
у середньому мозку, мкг/г	0,50±0,02	0,510±0,02
у новій корі, мкг/г	0,60±0,07	0,20±0,02*

Літературні дані про роль АДГ у формуванні потягу до алкоголю неоднозначні. З одного боку показано, що у генетичних ліній мишей з високим рівнем алкогольної мотивації більш висока активність АДГ [15]. В інших працях не виявлено різниці в активності АДГ у щурів з різним відношенням до алкоголю [12]. Суперечливі також дані відносно активності АЛДГ, ферменту, що окислює АцА, в мозку тварин з різним відношенням до Е [5]. Спостерігаються значні розбіжності в результатах з вивчення субклітинного розподілу АЛДГ, у використанні субстратів реакції, а також концентрацій цих субстратів. Деякі дослідження виконано на цілому мозку. Отримані нами результати відносно активності АЛДГ у тварин, які віддають перевагу Е і у тварин з відразу до нього до певної міри збігаються з даними гістохімічного дослідження АЛДГ мозку [6]. Авторами показано деяке переважання активності АЛДГ в окремих ділянках і структурах мозку щурів, які віддають перевагу Е. На основі цих даних можна припустити, що один із механізмів патологічного потягу до алкоголю у щурів I групи пов'язаний з вмістом АцА в мозку, який залежить від локальної активності АЛДГ. У літературі широко дискутується питання про нейромедіаторні механізми чутливості тварин до алкоголю. Проте єдиного погляду відносно ролі центральних моноамінів у регуляції довільного вживання Е до цього часу немає [1, 3, 7]. У той же час дисфункція в системі катехоламінів, про що свідчать отримані нами результати, може бути однією з причин підвищеного потягу до Е у щурів I групи.

Висновки

1. Щури, які надають перевагу алкоголю, та щури з відразу до нього не відрізняються між собою за активністю АДГ у цитоплазматичних фракціях гіпоталамуса, середнього мозку та нової кори, а також — у сироватці крові.

2. Виявлені ізоформи АЛДГ у цитоплазматичних фракціях структур мозку та в сироватці крові щурів з різним відношенням до алкоголю. Показано, що активність АЛДГ у щурів, які надають перевагу алкоголю, значно вища, ніж у щурів з відразу до нього.

3. Показано, що щури з різним відношенням до алкоголю відрізняються між собою за вмістом норадреналіну та дофаміну в окремих структурах мозку та крові.

N. K. Kharchenko, V. N. Sinitsky

SOME PHYSIOLOGICAL AND BIOCHEMICAL CHARACTERISTICS OF RATS INCLINATION TO THE USE OF ALCOHOL

Activity of aldehyde dehydrogenase (ALDH), alcohol dehydrogenase (ADH) in cytoplasmic fractions of brain structures (hypothalamus, midbrain, new cortex) and in blood serum as well as the content of noradreneline (NA) and dofamin (DA) in the mentioned structures and blood of rats preferring ethanol (PE) and rejecting ethanol (RE) has been investigated. ALDH isofoms have been revealed in rats preferring ethanol (PE) and these rejecting it (RE). The activity of the revealed forms of ALDH is higher in PE rats than in RE rats. PE and RE rats do not differ from one another as to ADH activity. It is shown that the NA content is decreased in PE rats and the DA level is increased in a number of brain structures and in blood as compared to RE rats.

*Ukrainian Scientific-Research Institute of Sociol and Forensic Psychiatry,
Ministry of Public Health of Ukraine, Kiev*

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Анохина И.П., Векшина Н.Л., Кузнецова М.Н. и др. Биологические механизмы предрасположенности к алкоголизму и нарушений функций мозга у потомства крыс с хронической алкогольной интоксикацией // *Вопр. наркологии.* — 1944. — №4. — С. 43-50.
2. Божко Г.Х. Роль ацетальдегида в механизмах действия этанола // *Успехи физиол. наук,* 1990. — 21, №3. — С. 98-116.
3. Буров Ю.В., Ведерникова Н.Н. Нейрохимия и фармакология алкоголизма. — М.: Медицина, 1985. — 94 с.
4. Гулый М.Ф., Синицький В.Н., Стогний Н.А. Способ лечения хронического алкоголизма (а.с. N 1591983 от 18 января 1988 г.) — М.: Госкомитет по изобретениям и открытиям. 15 мая 1990 г.
5. Зиматкин С.М. Альдегиддегидрогеназная система мозга: связь с устойчивостью и влечением к алкоголю // *Успехи соврем. биологии.* — 1991. — 3, вып. 5. — С. 654-666.
6. Зиматкин С.М., Линдрос К.О. Альдегиддегидрогеназа мозга линейных крыс, различающихся отношением к алкоголю // *Нейрохимия,* 1988. — 7, №4. — С. 607-610.
7. Кишанмаа К. Роль центральных моноаминовых нейронов в регуляции произвольного потребления этанола // *Фармакология и токсикология.* — 1989. — 52, №5. — С.4-10.
8. Коган Б.М., Нечаев Н.В. Чувствительный и быстрый метод одновременного определения дофамина, норадреналина, серотонина и 5-ОИУК в одной пробе // *Лаб. дело.* — 1975. — № 5. — С. 301-303.
9. Корниш-Боуден Э. Основы ферментативной кинетики. — М.: Мир, 1979. — 279 с.
10. Коноплицкая К.Л., Кузьмина Г.И., Кузьменко Л.А. Субклеточное распределение и свойства альдегиддегидрогеназы печени крыс // *Укр. биохим. журн.* — 1984. — 56, №6. — С. 624-628.

11. Комиссарова И.А., Магалиф А.Ю., Ротенберг Ю.С. и др. Молекулярные основы действия эндогенного и экзогенного этанола // Изв. АН СССР, сер. Биология. — 1983. — №2. — С. 260-268.
12. Островский Ю.М., Сатановская В.И., Островский С.Ю. Метаболические предпосылки и последствия потребления алкоголя. — Минск: Наука и техника. — 1988. — 263 с.
13. Полтавец В.И., Лагутин В.А. Актуальные направления поиска предикторов алкоголизма // МРЖ Психиатрия. — 1987. — **14**, №7. — С. 1-10.
14. Синицкий В.Н., Харченко Н.К. Роль ацетальдегида в патогенетических механизмах развития хронического алкоголизма // Фізіол. журн. — 1994. — **40**, №3-4. — С.94-101.
15. Скугаревская Е.И. К ацетальдегидной концепции алкогольной патологии. — В кн.: Алкогольная интоксикация и зависимость: механизмы развития, диагностика, лечение. — Минск: Беларусь, 1988. — 144 с.
16. Me Clearn G.E., Beunett E.L., Uerberf M. Alcohol dehydrogenase activity and previons ethanol consumption in mice // Nature. — 1964. — **203**, №4945. — P. 793-794.
17. Lowry O.H., Prosebrough N.G., Tarr A.L. at al. Protein measurement with the folin reagent // J.Biol. Chem. — 1951. — **193**, №1. — P. 265-275.
18. Schuckit M.A. Genetics and the rick for alcoholism // JAMA. — 1985. — **254**, №18. — P. 2614-2617.
19. Skursky L., Kowaz I., Stachova M. A Sensitive photometric assay for alcohol dehydrogenase activity in blood // Serum analyt. biochem. — 1979. — **99**. — P. 69-71.

*Укр. наук.-досл. ін-т
соц. та суд. психіатрії
М-ва охорони здоров'я України, Київ*

*Матеріал надійшов
до редакції 31.08.98*