

УДК 612.821.44+577.175.82

НЕЙРОТРАНСМИТТЕРНЫЕ АМИНОКИСЛОТЫ МОЗГА ГЕНЕТИЧЕСКИХ ЛИНИЙ РАЗНОТОЛЕРАНТНЫХ К ЭТАНОЛУ КРЫС

Островский С.Ю., *Киинмаа К.

Институт биохимии АН БССР, Гродно

*Исследовательские лаборатории фирмы «Алко», Хельсинки, Финляндия

Исследовано содержание нейротрансмиттерных аминокислот (ГАМК, Глу, Асп, Гли, Тау), некоторых их предшественников (Глн, Тре) и двух возможных нейромодуляторов (этаноламин и фосфоэтаноламин) в правом и левом полушариях, мозжечке и стволе мозга генетических линий высокотолерантных (АТ) и низкотолерантных (АНТ) к наркотическому действию алкоголя крыс. В левом полушарии АНТ крыс меньше, чем у АТ Гли и Глн, но соотношение суммы тормозных к возбуждающим аминокислотам у АТ линии ниже в левом полушарии и стволе мозга. Анализ корреляционных взаимоотношений всех исследованных показателей друг с другом свидетельствует о наличии существенных различий в формировании фонда и функционировании нейротрансмиттерных аминокислот в различных отделах мозга АТ и АНТ линий крыс.

* * *

Нейрохимические механизмы чувствительности животных и человека к действию этилового алкоголя широко обсуждаются по особенностям обмена АХ, катехоламинов, серотонина и ГАМК [1,2]. Три из названных нейромедиаторов являются прямыми производными аминокислот, одна из которых (Глу) сама выступает как нейротрансмиттер. Второй аминокислотой сходного с Глу механизма действия является Асп. Противоположными, тормозными эффектами, обладают Гли и Тау. Все названные аминокислоты вместе с ГАМК образуют единую систему, играющую важную роль в поддержании в ЦНС оптимальных базовых взаимоотношений между процессами торможения и возбуждения. Высказывается даже точка зрения, что функциональная готовность мозга в большей мере зависит от нейротрансмиттерных аминокислот, чем от классических нейромедиаторов, участвующих главным образом в реализации лишь части межнейрональных связей [3,4]. Особенности обмена и распределения в мозгу нейротрансмиттерных аминокислот в связи с проблемами изучения наркомании и алкоголизма до сих пор специально не рассматривались, хотя некоторые сведения об общем пуле всех свободных аминокислот мозга при алкогольной интоксикации уже описаны [2].

В патогенезе алкоголизма особая роль приписывается процессам,

обеспечивающим устойчивость (толерантность) мозга к действию этанола [5]. Простейшим способом тестирования толерантности является регистрация наркотического действия алкоголя по продолжительности сна в ответ на введение достаточно высокой дозы этанола. Показано, что АТ (короткоспящие) и АНТ (долгоспящие) животные представляют собой группы, в которых при хронической алкогольной интоксикации, с различной скоростью формируется физическая зависимость от алкоголя, являющаяся основным признаком алкоголизма [6]. Таким образом, разнотолерантные к этанолу животные могут рассматриваться как группы с различным риском в моделировании соответствующей патологии. Путем длительного отбора получены генетические линии крыс АТ по отношению к этанолу [7]. Изучение особенностей обмена веществ, и в частности классических нейротрансмиттеров [8,9], у таких животных рассматривается как один из перспективных подходов в исследовании патогенеза алкоголизма.

Материалы и методы

АТ и АНТ крыс из питомника Исследовательских лабораторий фирмы «Алко» (Финляндия) содержали на стандартном рационе питания. Животных (по 7 крыс в группе) массой 470—530 г декапитировали, мозг немедленно извлекали и разделяли на правое и левое полушария, мозжечок и ствол. Выделенные отделы немедленно погружали в жидкий азот, а затем гомогенизировали в растворе 3%-ной сульфосалициловой кислоты. Безбелковые центрифугаты использовали для определения нингидриноположительных соединений на автоматическом анализаторе аминокислот Т—339 (ЧССР) [10]. Полученные результаты оценивали на ЭВМ «Мера-Камак 125/СМ4А» по критерию достоверности различий и коэффициентам корреляции [11].

Результаты и обсуждение

По содержанию нейротрансмиттерных аминокислот АТ и АНТ крысы (табл.1) различаются по сравниваемым отделам мозга весьма незначительно. Только уровень Гли в левом полушарии АНТ животных несколько ниже и в том же отделе мозга меньше Глн, которому, как предшественнику Глу, сейчас так же приписываются нейрорегуляторные функции [12]. АТ животные, однако, отличаются от АНТ по распределению аминокислот между различными отделами мозга внутри каждой из групп. Уровни ГАМК и Глн, например, в мозжечке по сравнению с таковыми в полушариях и стволе мозга ниже только у АТ крыс. Для оценки интегративных характеристик состояния процессов торможения и возбуждения у сравниваемых групп животных используются суммарные показатели и их взаимоотношения (табл.2) [4]. При таком подходе в двух отделах мозга АНТ крыс четко регистрируется преобладание тормозных аминокислот над возбужда-

ющими. Полученные данные объясняют тот факт, что в ответ на одинаковую дозу алкоголя ANT животные спят дольше, чем AT и тестирование толерантности к этанолу по любому другому показателю, например, изменению ректальной температуры, может не совпадать с вызываемым алкоголем торможением ЦНС [5]. Достоин внимания и то обстоятельство, что право-левая асимметрия мозга четко выявляется при алкогольной патологии [13], и преобладание тормозных аминокислот только в левом полушарии ANT животных в этой связи, по-видимому, не является случайным.

Таблица 1

Содержание нейротрансмиттерных аминокислот в мозгу высокотолерантных AT и низкотолерантных ANT крыс, нмоль/г

Отделы мозга	ГАМК	Глу	Гли	Гли	Тау	Асп
AT крысы						
Правое полушарие	467±53	3043±467	579±64	311±24	3731±527	715±52
Левое полушарие	540±55	3281±420	624±67	330±18	4086±293	755±95
Мозжечок	329±29	1657±74	348±21	1019±32	2646±385	649±62
Ствол	515±64	3778±1261	633±119	289±36	3270±542	743±165
	*1-3 • 3-4 • 2-3	*1-3 • 2-3	*1-3 • 2-3 • 3-4	*1-3 • 2-3 • 3-4	*2-3	
ANT крысы						
Правое полушарие	729±157	4730±1195	841±198	338±59	6301±1418	1044±256
Левое полушарие	438±37	2524±499	447±55**	222±12**	4936±983	530±83
Мозжечок	456±81	1981±433	461±108	1025±282	4814±1442	694±166
Ствол	478±62	2933±388	667±93	291±34	4936±984	743±153
		• 1-3		• 1-3 • 2-3 • 3-4		

Примечание: *достоверные ($p<0,05$) различия между отделами мозга у крыс одной линии; **достоверные ($p<0,05$) различия между одноименными отделами AT и ANT крыс

Таблица 2

Интегративные показатели, характеризующие соотношение тормозных и возбуждающих нейротрансмиттерных аминокислот в мозгу AT и ANT крыс

Показатели	Правое полушарие AT ANT		Левое полушарие AT ANT		Мозжечок AT ANT		Ствол AT ANT	
ГАМК+Гли+Тау (мкМ)	4,5±0,5	6,8±1,3	5,0±0,3	5,6±1,0	4,0±0,4	6,3±1,8	4,1±0,5	4,7±0,5
Асп+Глу (мкМ)	3,8±0,5	5,8±1,4	4,0±0,5	3,1±0,5	2,3±0,1	2,7±0,5	4,5±1,4	3,7±0,5
ГАМК+Гли+Тау Асп+Глу	1,2±0,1	1,3±0,1	1,3±0,1	1,8±0,2*	1,7±0,2	2,2±0,3	1,1±0,1	1,4±0,1*

Более тонкие особенности формирования аминокислотных нейрот-

рансмиттерных пулов у АТ и АНТ крыс можно проследить на основании корреляционного анализа всех полученных данных. В табл.3 включены дополнительно сведения по фосфоэтаноламину (ФЭА) и этаноламину

Таблица 3

Коэффициенты корреляции (r) между нейротрансмиттерными аминокислотами мозга АТ и АНТ крыс (* $p < 0,05$)

Сравниваемые показатели	Правое полушарие		Левое полушарие		Мозжечок		Стол	
	АН	АНТ	АН	АНТ	АН	АНТ	АН	АНТ
ГАМК-Глу	0,57	0,98*	0,83*	0,21	0,03	0,90*	0,77*	0,55
ГАМК-Гли	0,83*	0,98*	0,85*	0,11	-0,55	0,92*	0,84*	0,74
ГАМК-Гли	-0,06	1,0*	0,85*	0,26	0,15	0,72*	0,94*	0,38
ГАМК-Тау	0,72*	0,96*	0,49	0,28	0,85*	0,88*	0,78*	0,63
ГАМК-Асп	0,87*	0,97*	0,81*	0,22	0,52	0,87*	0,84*	0,97*
ГАМК-Фза	0,42	0,58	0,55	0,31	0,42	0,50	-0,06	0,15
ГАМК-Эам	0,65	0,19	0,52	-0,20	0,35	0,14	-0,46	-0,07
Гли-Глу	0,29	0,98*	0,87*	0,25	0,90*	0,78*	0,90*	0,93*
Гли-Гли	-0,11	0,98*	0,87*	0,25	0,55	0,90*	0,95*	0,82*
Гли-Тау	0,44	0,97*	0,53	0,13	0,25	0,92*	0,90*	0,69
Гли-Асп	0,26	0,98*	0,82*	0,31	0,39	0,94*	0,95*	0,50
Гли-Фза	0,79*	0,60	0,50	0,81*	0,34	0,44	0,14	0,38
Гли-Эам	0,35	0,21	0,17	-0,60	-0,38	0,18	-0,50	-0,19
Тау-Глу	0,60	0,99*	0,74*	0,71*	0,09	0,92*	0,84*	0,67
Тау-Гли	0,71*	0,97*	0,76*	0,63	-0,27	0,93*	0,87*	0,60
Тау-Асп	0,42	0,98*	0,76*	0,69	0,61	0,94*	0,84*	0,68
Тау-Фза	0,80*	0,70*	0,77*	0,25	0,37	0,34	0,23	0,75*
Тау-Эам	0,45	0,14	-0,30	-0,23	0,06	0,23	-0,36	-0,52
Глу-Гли	0,73*	1,0*	0,97*	0,96*	0,53	0,99*	0,99*	0,93*
Глу-Асп	0,44	1,0*	0,99*	0,99*	0,38	0,73*	0,97*	0,65
Глу-Фза	0,34	0,59	0,80*	0,29	0,57	0,22	0,08	0,29
Гли-Эам	0,21	0,16	-0,01	-0,32	-0,19	-0,09	-0,69*	0,01
Асп-Гли	0,80*	0,99*	0,97*	0,97*	0,28	0,94*	0,99*	0,83*
Асп-Фза	0,56	0,14	0,79*	0,35	0,16	0,48*	0,12	0,17
Асп-Эам	0,43	0,14	-0,04	-0,37	0,30	-0,01	-0,58	-0,03

Примечание. *статистически значимые различия с контролем при $p = 0,05$; **различия статистически достоверные в сравнении с шоком ($p < 0,001$)

(ЭАМ), поскольку двум последним производным аминокислот приписываются нейромодуляторные функции [14,15]. В основном наборе нейротрансмиттерных аминокислот, сопоставленном с уровнем ГАМК, сразу бросается в глаза различие между правым и левым полушариями мозга сравниваемых групп животных. Правое полушарие АНТ крыс функционально

подобно (по коэффициентам корреляции) левому полушарию АТ животных. Сходная картина воспроизводится и со вторым (Гли) тормозным компонентом. Еще более выражена указанная выше закономерность в отношении Тау. Из данных табл.3 также следует, что симметричные полушария мозга высоко- и низкотолерантных к этанолу животных по их аминокислотному нейротрансмиссерному пулу организованы неодинаковым образом. Соответствующий физиологический эксперимент на основании полученных данных позволил бы протестировать право-левую асимметрию [16] тех же животных в поведенческих моделях.

Взаимоотношения интересующих нас аминокислот в мозжечке (табл.3) весьма существенно различаются по более высокой сопряженности показателей у АНТ крыс по сравнению с АТ. По-видимому, в этом отделе мозга у животных более чувствительных к тормозному (наркотическому) действию этанола все аминокислоты (тормозные и возбуждающие) активно участвуют в противодействии внешнему дестабилизирующему состоянию ЦНС агенту. Особых качественных (по знаку коэффициента корреляции) различий в формировании пула нейротрансмиссерных аминокислот ствола мозга сравниваемых крыс не выявляется. Можно говорить лишь о некоторых более достоверных связях показателей в парах с ГАМК, Гли и Тау для АТ животных.

Уровень Гли как нейромедиатора трудно оценивать в связи с использованием аминокислоты в целом ряде других общеметаболических процессов [17,18]. Тре как специфический предшественник Гли заслуживает при этом отдельного рассмотрения, поскольку в треонинальдолазной реакции, помимо Гли, образуется ацетальдегид, которому в последнее время приписывается роль не только в механизмах алкогольной интоксикации, но также и в патогенезе алкоголизма [19]. Судя по нашим показателям (табл.4), Тре по-разному используется как предшественник Гли в различных отделах мозга АТ и АНТ крыс. Интересно, что и другой (Сер) предшественник Гли повторяет те же закономерности. По-видимому, все три аминокислоты образуют достаточно взаимосвязанную систему глицинового гомеостаза при участии треонинальдолазы и серинметилтрансферазы [18], которые функционируют с некоторыми особенностями у толерантных к алкоголю животных. Подобие взаимоотношений двух аминокислот (Сер, Тре) с продуктами их катаболизма (Гли) дает право на утверждение, что образование тормозного нейротрансмиссера важнее, чем эндогенный синтез ацетальдегида в треонинальдолазной реакции [19]. В этой связи становятся понятными и ранее полученные возможности активно влиять на уровень глицина в нервной ткани путем дополнительного парентерального введения крысам Тре [20].

Таблица 4

Корреляционные взаимоотношения (r) в метаболическом пуле Глн в отделах мозга (АТ) и (АНТ) крыс ($*p < 0,05$)

Сравнимые показатели	Правое полушарие		Левое полушарие		Мозжечок		Стол	
	АТ	АНТ	АТ	АНТ	АТ	АНТ	АТ	АНТ
Тре-Гли	0,32	0,86*	0,85*	0,95*	0,30	0,92*	0,98*	0,36
Сер-Гли	0,28	0,97*	0,35	0,49	-0,05	0,97*	0,79*	0,34
Сер-Тре	0,85*	0,90*	0,33	0,35	0,07	0,95*	0,72*	0,95*

В связи с анализом корреляционных взаимоотношений в пуле нейротрансмиттерных аминокислот уместно остановиться на некоторых более общих закономерностях, выявляемых при анализе экспериментальных данных. Обращает на себя внимание независимая от линий животных и отделов мозга положительная взаимосвязь сдвигов в паре Глу—Гли (табл.3). Этим объясняется частичное совпадение корреляций ГАМК—Гли с таковыми для ГАМК—Глу, поскольку первый участник этой пары показателей образуется только из Глу. Аналогичная закономерность прослеживается и в отношении Асп—Гли при сравнении с Асп—Глу. Полученные результаты находятся лишь в кажущемся противоречии с результатами опытов, в которых исследовали судьбу равномерно меченного Гли в сенсорно-двигательной зоне коры мозга животных. В элюенте, получаемом при кратковременном деполяризующем стимулировании этого участка мозга, метка из Гли сразу же обнаруживалась, в основном, в составе Глу, но не ГАМК [21]. Решающим фактором в оценке приведенных данных, по нашему мнению, являются различия в сравниваемых временных интервалах, поскольку наши расчеты (табл.3) характеризуют значительно более длительные периоды функционирования системы. Прямое влияние Гли на уровень ГАМК в мозгу было продемонстрировано нами ранее [22] в опытах на животных с различной выраженностью алкогольной мотивации. Полученные данные указывают на несомненную роль Гли как депо Глу в мозгу, а не только как простого переносчика аммиака из ЦНС в печень и почки [23]. Первая функция при этом представляется более важной, чем вторая, поскольку при обратных оценках соответствующие (Гли—Глу) коэффициенты корреляции были бы отрицательными, а не положительными. Седативные эффекты Гли, обусловленные, как это следует из наших данных, влиянием на уровень ГАМК в мозгу, уже используются в медицине [24].

Сопряженность сдвигов в содержании Тау и ФЭА, известная по наблюдениям других авторов для гиппокампа [14], подтверждена нами и для полушарий мозга. Вообще нейромодуляторные функции ФЭА и ЭАМ [14,15], если они и проявляются в каких-то частных экспериментальных

условиях, общей роли в распределении основных нейротрансмиттерных аминокислот, по-видимому, не играют. Количество достоверных корреляционных коэффициентов в соответствующих парах относительно невелико. Можно отметить лишь, что наработка ФЭА и ЭАМ в киназной реакции [25], возможно, имеет определяющее значение только в левом полушарии ($r = -0,92$) и стволе ($r = -0,75$) мозга ANT крыс. Уровень ФЭА в других отделах мозга определяется множеством других переменных, не учитываемых примененным нами анализом.

Резюмируя все изложенные данные, можно утверждать, что генетические линии разнотолерантных к наркотическому действию этанола крыс (AT и ANT) отличаются друг от друга по содержанию Гли и Глн в левом полушарии мозга, по преобладанию тормозных аминокислот над возбуждающими в левом полушарии и стволе мозга ANT животных и по взаимоотношениям различных нейротрансмиттерных аминокислот друг с другом во всех исследованных отделах мозга.

BRAIN NEUROTRANSMITTER AMINO ACIDS IN GENETIC STRAINS OF RATS WITH DIFFERENT TOLERANCE TO ETYL ALCOHOL

Ostrovsky S.Yu., *Kiinmaa K.

Institute of Biochemistry, Byelorussian

*SSR Academy of Sciences, Grodno, *Alco Research Laboratories, Helsinki, Finland*

Concentration of neurotransmitter aminoacids (GABA, Gly, Asp, Glu, Tau), some of their precursors (Gln, Thr) and two possible neuromodulators (ethanolamine and phosphoethanolamine) were studied in the right and left hemispheres, cerebellum and brain stem of rat strains with high (AT) and low tolerance (ANT) to the hypnotic effect of ethanol. The left hemisphere of ANT rats had lower concentrations of Gly and Gln than that of AT rats, but the ratio of the total amount of inhibitory aminoacids to excitatory ones was lower in the left hemisphere and brain stem of the AT strain. Analysis of correlation between various indexes indicated significant differences in the formation of the pool and functioning of neurotransmitter aminoacids in different brain regions of AT and ANTrat strains.

ЛИТЕРАТУРА

1. Боброва Н.П. — В кн.: Этанол и обмен веществ (под ред. Ю.М. Островского), с.104—118, Минск, Наука и техника, 1982.
2. Сытинский И.А. Биологические основы действия этанола на центральную нервную систему, М., Медицина, 1980.
3. Bloom F.E., Am.J.Physiol., v.246, N3, p.184, 1984.
4. Cooper J.R., Bloom F.E., Roth R.H. The biochemical basis of neuropharmacology, N.Y., Oxford

Univ. Press, 1978.

5. *Tabakoff B., Melchior C.L., Hoffman P.L.* Alcoholism: Clin.Exp.Res., v.6, p.356, 1982.
6. *Fuller J.L.* —In: Animal Models in Alcohol Research, L.—N.Y., Acad.Press, p.57, 1980.
7. *Eriksson K.* —In: Animal Models in Alcohol Research, L.—N.Y., Acad.Press, p.3, 1980.
8. *Antee L., Attila L., Kinnmaa K.* —In: Animal Models in Alcohol Research, L.—N.Y., Acad.Press, p.51, 1980.
9. *Pisma J.P., Huttunen M., Sarviharju M., Ylikari R.* Alcohol and Alcoholism, v.21, N2, p.181, 1986.
10. *Дзевени Т., Терзей Я.* Аминокислоты, пептиды и белки, М., Мир, 1976.
11. *Рокицкий П.Ф.* Биологическая статистика, Минск, Высшая школа, 1973.
12. *Yöüing A., Bradford H.* J.Neurochem., v.47, N5, p.1399, 1986.
13. *London W.* P.Alcohol, v.4, N3, p.207, 1987.
14. *Lehman A., Hamberger A.* J.Neurochem., v.42, N5, p.1286, 1984.
15. *Wolfensberger M., Felix D., Cuenod M.* Neurosci.Lett., v.32, N1, p.53, 1982.
16. *Костандов Э.А.* Функциональная асимметрия полушарий мозга и неосознаваемое восприятие, М., Наука, 1983.
17. *Montis G., Beaumont K., Javoy-Agid F.* J.Neurochem., v.38, N3, p.718, 1982.
18. *Musil J., Novakova O., Kunz K.* Biochemistry in Schematic Perspective, Prague, Avicenum, 1977.
19. *Островский Ю.М., Садовник М.Н., Сатановская В.И.* Биологический компонент в генезисе алкоголизма, Минск, Наука и техника, 1986.
20. *Maher T.J., Wurtman R.J.* Life Sci., v.26, N16, p.1283, 1979.
21. *Thanki C.M., Sugden D., Thomas A., Bradford H.F.* J.Neurochem., v.41, N3, p.611, 1983.
22. *Ostrovsky S.Yu.* Subst.Alcohol Actions/Misuse, v.5, p.247, 1985.
23. *Cooper A. Plum F.* Physiol.Rev., v.67, N2, p.440, 1985.
24. *Negwer M.N.* Organic Chemical Drugs and Their Synonyms, Berlin, Academic-Verlag, 1971.
25. *Kunishita T.J.* J.Neurochem., v.48, N1, p.1, 1987.

Поступила 13.10.1988