



УДК 612.815.1:616—092/.9+615—092:615.711.1

РЕЦЕПТОРНЫЕ СИСТЕМЫ ГОЛОВНОГО МОЗГА КРЫС РАЗЛИЧНОЙ ТИПОЛОГИЧЕСКОЙ ПРИНАДЛЕЖНОСТИ ПРИ СТРЕССЕ, ДОБРОВОЛЬНОМ ПОТРЕБЛЕНИИ ЭТАНОЛА И СУБХРОНИЧЕСКОМ ПРИМЕНЕНИИ МЕБИКАРА И БЕФОЛА

КИРИАКОВ Г. В., РОЖАНЕЦ В. В., РУСАКОВ Д. Ю.,
КОЛОДКИНА И. Г., КАМПОВ-ПОЛЕВОВ А. Б., МАПСКИЙ А. И.,
ЛЕЖАВА Г. Г.

НИИ фармакологии АМН СССР, Москва

Изучено влияние хронического психогенного стресса на добровольное потребление этанола, а также на характеристики бензодиазепиновых рецепторов (БДР), β -адренорецепторов (β -АР) и активность аденилатциклазы (АЦ) головного мозга крыс, высокоактивных (ВА) и низкоактивных (НА) в тесте неизбежаемого плавления. Разделение крыс в этом тесте позволяет выявить группу (ВА животные), в которой хронический психогенный стресс приводит к увеличению потребления алкоголя. При этом только у этих крыс алкоголь предотвращает увеличение относительного веса надпочечников, вызываемое стрессом. У обоих типов животных стрессирование сопровождается десенситизацией изучаемых рецепторов и АЦ. Потребление этанола предотвращает развитие субчувствительности β -АР, но не уменьшение активности изопротеренолчувствительной АЦ у ВА животных, в то время как у НА крыс эффект алкоголя наблюдается в отношении лишь базальной активности АЦ. Можно предположить, что характер влияния стресса на потребление этанола у ВА животных определяется чувствительностью их адренергической системы к воздействию алкоголя.

Субхроническое введение мебикара приводит к уменьшению потребления этанола в группе лишь ВР крыс, а бефолы—только в группе НА животных. Анализ изменений концентраций β -АР после применения данных препаратов подтверждает роль адренергической системы в механизмах алкогольной мотивации ВА, но не НА крыс.

Участие БДР и β -АР рецепторов в формировании реакции на стресс доказано многочисленными исследованиями [1—5]. Известно кроме того, что на фоне стресса возможно также и увеличение добровольного потребления крысами раствора этанола, связанное, как считают, с его транквилизирующими свойствами [6], которые, в свою очередь, опосредуются ГАМК-бензодиазепиновым рецепторным комплексом [7]. Показано, что такое влияние стресс оказывает не на всех животных гетерогенной популяции [8]. Возникают следующие вопросы: какими типологическими особенностями экспериментальных животных может определяться способность стресса индуцировать у них алкогольную мотивацию, и не связаны ли различные эффекты стресса на добровольное потребление этанола с неоднознач-

ными реакциями на алкоголь и стресс БДР, β -АР и соответствующей АЦ у этих типов животных.

Целью настоящей работы явилось изучение действия хронического психогенного стресса на потребление этанола у животных с различными типами поведенческого реагирования с последующим исследованием характеристик БДР, β -АР и изопротеренолзависимой аденилатциклазы головного мозга этих же животных. Все указанные показатели исследовали также при субхроническом применении транквилизатора мексикара и атипичного антидепрессанта бефол (препаратов, используемых в клинике алкоголизма) у животных с алкогольной мотивацией, сформированной на фоне стресса.

Материалы и методы

Опыты проводили на беспородных крысах-самцах массой 200—250 г.

Поведенческое типирование животных проводили в условиях неизбежного плавания по методике, предложенной нами ранее [9]. Для эксперимента отбирали ВА животных, у которых время иммобилизации в тестовых условиях составило менее 120 с за 600 с наблюдения и НА крыс, у которых общее время иммобилизации превышало 300 с.

Отбор НА и ВА крыс проводили по результатам двойного тестирования с интервалом в 24 ч. Затем животных обоих типов подвергали хроническому психогенному стрессу, стохастически подкрепляя ударами тока световые сигналы [10]. Крыс содержали в индивидуальных клетках при избытке пищи и свободном доступе к воде и 15%-ному раствору этанола. Потребляющими этанол считали животных, в поилках которых уменьшение раствора спирта было больше 2 мл в сутки (самопроизвольная потеря жидкости в поилке в наших условиях составляла до 2 мл в сутки). Стрессирование прекращали на 15-й день, и с 16-го дня 2 раза в день в течение 10 суток потребляющим этанол животным обоих типов вводили внутривентрикулярно физиологический раствор (1 мл), мексикар (100 мг/кг) или бефол (1 мг/кг). Крыс контрольной группы декапитировали через 24 ч после последнего тестирования; группы не потребляющих и потребляющих этанол крыс—через 24 ч после последнего стресс-воздействия; животных, получавших физиологический раствор, мексикар и бефол—через 24 ч после последнего введения препаратов. Выраженность стресс-реакции оценивали по относительной массе надпочечников (мг/кг массы животного). Во всех группах обоих типов животных изучали состояние БДР, β -АР и сопряженной с ними АЦ чистой фракции синаптических мембран головного мозга.

Чистую фракцию синаптических мембран выделяли центрифугированием в градиенте сахарозы [11], объединяя попарно мозги крыс одной группы (каждая группа состояла из 8 крыс). В каждом полученном мембранном препарате изучали специфическое связывание [3 H]диазепама [12], [3 H]дигидроалprenолола [13], а также определяли скорость образования α -[32 P] сАМР из α -[32 P] АТР [14]. Параметры рецепторного связывания—величину K_d комплекса рецептор-лиганд и концентрацию рецепторов (B_{max}) определяли в координатах Скэтчарда для каждого мембранного препарата, а затем усредняли по группам. Изопротеренолчувствительную активность АЦ подсчитывали как разность скорости накопления α -[32 P] сАМР в

присутствии 10^{-6} М изопротеренола и в его отсутствие (базальная активность) для каждого препарата в отдельности, а затем также усредняли по группам. Достоверность различий оценивали с использованием *t*-критерия Стьюдента.

Результаты и обсуждение

Результаты проведенной работы показали, что 15-дневный стресс вызывал увеличение доли потребляющих этанол ВА крыс (45% без стресса и 58% на фоне стресса, $p=0,05$, точный метод Фишера) и практически не менял этого показателя у НА животных (79% без стресса и 73% на фоне стресса). Стресс-реакция была выражена ($p \leq 0,05$) у не потребляющих этанол животных обоих типов (относительная масса надпочечников в мг/кг: контроль— 84 ± 4 у ВА и 78 ± 9 у НА животных; крысы, не потребляющие этанол— 106 ± 9 у ВА и 107 ± 3 у НА животных). Для потребляющих алкоголь животных стресс-реакция была выражена лишь у НА крыс (относительная масса надпочечников у ВА животных 90 ± 4 мг/кг, а у НА— 127 ± 10 мг/кг, $p \leq 0,05$). Эффект препаратов на потребление этанола стрессированными крысами зависел от их типологической принадлежности: мебикар активен у ВА, а бефол—у НА животных (табл. 1).

Таблица 1

Влияние введения психотропных препаратов на количество потребляющих этанол животных разной типологической принадлежности

	Высокоактивные	Низкоактивные
Физиологический раствор	0.94 ± 0.06	0.87 ± 0.09
Мebикар	$0.59 \pm 0.10^{1,3,*}$	0.88 ± 0.08
Бефол	0.94 ± 0.06	$0.52 \pm 0.10^{1,2,*}$

Примечание. Приведены значения $M \pm m$ доли потребляющих этанол животных после 10-дневного введения (2 раза в день) физиологического раствора (1 мл), мебикара (100 мг/кг) или бефола (1 мг/кг) крысам, потреблявшим алкоголь на фоне стресса. 1, 2, 3—достоверные отличия соответственно от групп: физиологический раствор, мебикар и бефол животных одного типа, *—отличия от соответствующей группы иного типа животных. Здесь и в табл. 2—4— $p \leq 0,05$ по *t*-критерию Стьюдента.

В исходном состоянии у ВА и НА крыс не выявлено различий в количестве БДР, в то время как аффинность рецепторов к диазепаму у ВА животных была существенно выше (табл. 2). Хронический психогенный стресс приводил к уменьшению плотности рецепторов у не потребляющих этанол животных обоих типов, нивелируя исходные отличия в их аффинности. В противоположность этому, у потребляющих при стрессе алкоголь животных обоих типов не обнаружено уменьшения концентрации БДР, а их аффинность у ВА крыс оказалась уменьшенной. Введение физиологического раствора не влияло на параметры связывания [3 H]диазепама с синаптическими мембранами потребляющих этанол животных. Мebикар вызывал уменьшение K_d БДР у обоих типов крыс, в то время как влияние на эти рецепторы бефола обнаружено лишь для НА животных.

Как видно из табл. 3, сродство к ди гидроалprenололу β -АР у интактных ВА крыс было больше, чем у НА животных при одинаковой плотности у них этих рецепторов. Во всех группах стрессированных животных, за исключением потребляющих этанол ВА крыс, наблюдалась редукция количества β -АР, которая у НА животных сопровождалась увеличением их сродства к ди гидроалprenололу. 10-

Таблица 2

Влияние стресса, потребления этанола и введения психотропных препаратов на характеристики бензодиазепиновых рецепторов мозга крыс разной типологической принадлежности

	Высокоактивные		Низкоактивные	
	$K_d(\text{нМ})$	$B_{\text{max}}\left(\frac{\text{фмоль}}{\text{мг белка}}\right)$	$K_d(\text{нМ})$	$B_{\text{max}}\left(\frac{\text{фмоль}}{\text{мг белка}}\right)$
Контроль	0.59 ± 0.10	1291 ± 126	$1.18 \pm 0.09^*$	1544 ± 165
Не потребляющие этанол	0.52 ± 0.06	869 ± 16^1	0.41 ± 0.01^1	875 ± 143^1
Потребляющие этанол	$1.69 \pm 0.14^{1,2}$	1407 ± 58^2	$1.21 \pm 0.09^{2,*}$	1591 ± 165^2
Физиологический раствор	$1.45 \pm 0.15^{1,2}$	1432 ± 60^2	1.34 ± 0.13^2	1684 ± 96^2
Мебикар	$1.19 \pm 1.12^{1,2,3}$	1401 ± 688^2	$0.84 \pm 0.10^{1,2,3,4}$	1791 ± 163^2
Бефол	$1.94 \pm 0.32^{1,2}$	1669 ± 242^2	$0.82 \pm 0.12^{1,2,3,4}$	$1338 \pm 56^{2,4,5}$

Примечание. Здесь и в табл. 3: 1—5—достоверные отличия соответственно от групп: контроль, не потребляющие этанол, потребляющие этанол, физиологический раствор, мебикар животных одного типа; *—достоверные отличия от показателей соответствующей группы иного типа.

Таблица 3

Влияние стресса, потребления этанола и введения психотропных препаратов на характеристики β -адренергических рецепторов мозга крыс разной типологической принадлежности

	Высокоактивные		Низкоактивные	
	$K_d(\text{нМ})$	$B_{\text{max}}\left(\frac{\text{фмоль}}{\text{мг белка}}\right)$	$K_d(\text{нМ})$	$B_{\text{max}}\left(\frac{\text{фмоль}}{\text{мг белка}}\right)$
Контроль	0.53 ± 0.06	220 ± 27	$0.87 \pm 0.12^*$	271 ± 22
Не потребляющие этанол	0.42 ± 0.03	113 ± 6^1	$0.24 \pm 0.02^{1,*}$	97 ± 18^1
Потребляющие этанол	0.66 ± 0.06^2	234 ± 19^2	$0.34 \pm 0.06^{1,*}$	$130 \pm 22^{1,*}$
Физиологический раствор	0.56 ± 0.09	181 ± 17^2	0.41 ± 0.08^1	146 ± 16^1
Мебикар	$0.98 \pm 0.11^{1,2,4}$	$342 \pm 39^{1,2,3,4}$	$0.42 \pm 0.14^{1,*}$	$241 \pm 47^{1,3,4}$
Бефол	$0.33 \pm 0.03^{1,3,5}$	166 ± 33^5	0.43 ± 0.10^1	$176 \pm 14^{1,2}$

дневное введение физиологического раствора не меняло состояния β -АР как у ВА, так и у НА крыс. Лечение мебикаром, но не бефолом, вызывало увеличение концентрации этих рецепторов у обоих типов животных. Препараты оказывали противоположное влияние и на аффинность рецепторов ВА крыс.

Данные по изучению базальной и изопротеренолчувствительной активности АЦ не показали существенных отличий этого фермента у крыс разной типологической принадлежности (табл. 4). У крыс обоих типов, подвергнутых хроническому стрессированию, но не потребляющих при стрессе алкоголь, снижалась базальная активность АЦ. У ВА животных, потребляющих при стрессе этанол, падала и активность изопротеренолстимулируемой АЦ. У НА крыс как базальная,

Таблица 4

Влияние стресса, потребления этанола и введения психотропных препаратов на активность изопротеренолчувствительной аденлатциклазы мозга крыс разной типологической принадлежности

	Высокоактивные		Низкоактивные	
	Базальная активность	Изопротеренол-чувствительная активность	Базальная активность	Изопротеренол-чувствительная активность
Контроль	109 ± 21	14 ± 3	82 ± 30	15 ± 5
Не потребляющие этанол	60 ± 8 ¹	21 ± 6	35 ± 7*	11 ± 2
Потребляющие этанол	61 ± 6 ¹	7 ± 1 ^{1,2}	95 ± 23 ²	13 ± 4
Физиологический раствор	129 ± 11,2,3	6 ± 1,2	27 ± 31,3	27 ± 42,3*
Мебикар	101 ± 29,3,4	36 ± 12,3,4	149 ± 122,3,4	28 ± 54,3
Бефол	28 ± 31,2,3,5	2,5 ± 21,3,4	12 ± 214,5*	20 ± 7

Примечание. Данные приведены в пмоль сАМР/мг белка/мин; 1—5—достоверные различия соотношения от групп: контроль, не потребляющие этанол, потребляющие этанол, физиологический раствор, мебикар животных одного типа; *—отличия от соответствующей группы иного типа животных.

так и изопротеренолзависимая активность АЦ при потреблении алкоголя на фоне стресса не отличалась от контрольной. Через 10 дней в группах крыс, получавших физиологический раствор, наблюдалось значительное уменьшение базальной активности АЦ, сопровождающееся у НА крыс увеличением чувствительности к изопротеренолу. Мебикар восстанавливал базальную активность у обоих типов животных, а у ВА крыс нормализовал и стимуляцию АЦ изопротеренолом. Бефол, в свою очередь, увеличивал активность лишь сопряженной с β -АР АЦ у ВА животных, не восстанавливая у них базальной активности. В противоположность этому у НА крыс лечение этим препаратом корригировало как базальный, так и чувствительный к изопротеренолу уровень активности АЦ.

Ранее рядом исследователей [15, 16] также отмечались схожие изменения базальной активности АЦ при стрессе и введении различных психотропных препаратов. На наш взгляд, одной из причин наблюдаемых отличий базальной активности АЦ в разных группах может являться различное содержание в соответствующих мембранных препаратах эндогенных стимуляторов этого фермента (норадреналина, дофамина и др.). Присутствием разных концентраций норадреналина в используемых мембранных препаратах могут объясняться и полученные отличия кажущейся аффинности β -АР к антагонисту (дигидроалprenололу), которые могут возникать и за счет изменений текучести мембран в разных группах. Микровязкостью мембран может модулироваться и сопряжение АЦ с β -АР [17]. Изменения изопротеренолчувствительной активности АЦ, как видно из наших

данных (табл. 3, 4), не всегда сопровождаются соответствующими изменениями плотности β -АР. Это свидетельствует о разном сопряжении рецептора с изученной эффекторной системой в разных группах.

Результаты проведенного исследования показали, что у не потребляющих этанол при стрессе животных обоих типов развивается десенситизация изученных рецепторов и АЦ (табл. 2—4). Различные виды стресса, как известно, могут приводить к уменьшению концентрации БДР [1—3]. Неоднократно описана и субчувствительность β -АР и сопряженной с ними АЦ головного мозга в ответ на усиление секреции катехоламинов при стрессовых воздействиях [4, 5]. Сообщалось также о десенситизации БДР, β -АР и АЦ у ВА и НА животных, не находившихся в контакте с алкоголем и подвергнутых такому же психогенному стрессу, как и в настоящей работе [16]. Принимая все это во внимание, можно сделать вывод, что отличия, выявленные в нейрохимических характеристиках головного мозга животных, потребляющих и не потребляющих этанол при стрессе, отражают не те индивидуальные особенности, которые определяют отношение к алкоголю, а само влияние этанола на эти параметры.

Таким образом, полученные данные позволяют сделать заключение о выраженности антистрессового действия алкоголя у ВА животных, так как потребление ими этанола в период стресса предотвращало и увеличение массы надпочечников, и уменьшение количества БДР и β -АР. По-видимому, именно этим можно объяснить увеличение доли ВА крыс, потребляющих этанол при хроническом стрессировании. Возможно, что чувствительность к антистрессовым эффектам алкоголя ВА животных связана с выявленной исходно большей аффинностью БДР их головного мозга при одинаковой плотности этих рецепторов у обоих типов крыс (ранее мы показали, что анксиолитические эффекты малых доз этанола реализуются с участием ГАМК-бензодиазепинового рецепторного комплекса [7]). Большую чувствительность бензодиазепиновой системы к этанолу у ВА животных отражает также и уменьшение кажущейся аффинности их БДР при потреблении алкоголя. Этот эффект может являться проявлением увеличенной продукции эндогенных лигандов БДР под влиянием этанола у ВА крыс. Можно предположить, что с исходной гипочувствительностью БДР у НА животных связана и практическая неэффективность у них мебикара, действие которого также опосредуется ГАМК-бензодиазепиновым рецепторным комплексом [18]. В основе различной эффективности препаратов может лежать и неодинаковое влияние их на изученные нейрохимические системы. Так, мебикар, но не бефол, частично нормализовал аффинность БДР у ВА животных, то есть животных, у которых именно он подавлял потребление этанола. В то же время, активный у НА животных препарат бефол уменьшал у них, но не у ВА крыс, концентрацию БДР. Разнонаправленное влияние бефол и мебикар оказывали также на количество β -АР и их родство к диэтилоэтилендиамину у ВА крыс. Способность препаратов корригировать базальную активность АЦ полностью совпадает с их воздействием на потребление этанола разными типами животных.

Следует особо подчеркнуть, что потребление этанола предотвращает развитие субчувствительности β -АР, но не уменьшение активности изопротеренолчувствительной АЦ у ВА животных, в то время как у НА крыс эффект алкоголя наблюдается в отношении лишь базальной активности АЦ. Можно предположить, что характер влия-

ния стресса на потребление этанола у ВА животных связан с тем, что в отличие от НА крыс, их адренергическая система чувствительна к действию алкоголя. В свою очередь, субхроническое введение мебикара также лишь у ВА животных приводит к достоверному увеличению концентрации β -АР выше контрольного уровня. Обращает на себя внимание тот факт, что и этанол, и мебикар, подавляющий его потребление у животных этого типа, действуют в этом отношении однонаправленно.

Таким образом, анализ действия стресса, этанола и использованных препаратов на концентрацию β -АР позволяет предположить, что алкогольная мотивация у ВА животных связана с чувствительностью адренергической системы головного мозга к этанолу и эффективно в данных условиях мебикару. В случае НА животных прямой связи между алкогольной мотивацией и состоянием адренергической системы не наблюдается.

BRAIN RECEPTOR SYSTEMS IN RATS WITH DIFFERENT TYPOLOGICAL TAXONOMY DURING STRESS: VOLUNTARY ETHYL ALCOHOL CONSUMPTION AND SUBCHRONIC TREATMENT WITH BEFOL AND MEBICAR

KIRIAKOV G. V., ROZHANETS V. V., RUSAKOV D. YU., KOLODKINA N. G.,
KAMPOV-POLEVOI A. B., MAISKY A. I., LEZHAVA G. G.

Institute of Pharmacology, USSR Academy of Medical Sciences, Moscow

The effect of the psychogenic stress on the voluntary ethanol consumption, brain benzodiazepine receptors (BDR), beta-adrenoreceptors (β -AR) and the activity of coupled adenylate cyclase (AC) were studied in rats, with high activity (HA) and low activity (LA) in the forced swimming test. The division of rats in this test made it possible to identify a group of animals in which the chronic psychogenic stress led to increased alcohol consumption. Ethyl alcohol intake prevented the stress-induced increase in the relative weight of adrenal glands only in HA rats. Stress resulted in desensitization of the studied receptors and AC in both types of animals. Ethanol intake prevented the development of subsensitivity of β -AR, but did not affect the decreased activity of the isoproterenol-sensitive AC in the HA animals, while in the LA rats the alcohol consumption affected only basal AC activity. We propose that the effect of the stress on ethanol consumption in the HA animals is determined by the sensitivity of their adrenergic system to the influence of alcohol intake.

Subchronic administration of Mebicar decreased ethanol consumption only in the HA group of rats and of Befol—only in the LA group. Analysis of changes in concentrations of β -AR after the administration of these drugs confirms the role of the adrenergic system in the mechanisms of alcohol motivation in HA and not in LA rats.

ЛИТЕРАТУРА

1. Braestrup C., Nielsen M., Nielsen E. B. *Psychopharmacology*, v. 65, p. 273—277, 1979.
2. Ledoux J. E., Sahaguchi A., Reis D. J. *Brain Res.*, v. 216, p. 399—408, 1983.
3. Petkov V. V., Yanev S. *Pharm. Res. Commun.*, v. 14, p. 739—744, 1982.

4. Вальдман А. В. — В кн.: Нейрофармакология антидепрессантов (под ред. А. В. Вальдмана), с. 9—50, М., 1984.
5. Stone E. A. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, v. 7, p. 503—509, 1983.
6. Буров Ю. В., Ведерникова Н. Н. Нейрохимия в фармакология алкоголизма, М., Медицина, 1985.
7. Кириаков Г. В., Рожанец В. В., Русаков Д. Ю., Малин К. М., Вальдман А. В. — В кн.: Медико-биологические проблемы алкоголизма (Материалы Всесоюзной конф., Воронеж, 1987), с. 45—50, М., 1988.
8. Rockman G. E., Hall A., Hong J., Glavin G. B. *Life Sci.* v. 40, p. 1245—1252, 1987.
9. Каклюв-Полевый А. Б. — В кн.: Фармакология экспериментального алкоголизма (под ред. Ю. В. Бурова), с. 130—135, М., 1982.
10. Данчев Н. Д., Рожанец В. В., Вальдман А. В. Бюл. экспер. биол., С1, N1, с. 57—59, 1986.
11. De Robertis E. et. al. *J. Neurochem.*, v. 9, p. 23—35, 1962.
12. Рожанец В. В., Русаков Д. Ю., Данчев Н. Д., Вальдман А. В. Бюл. экспер. биол., т. 96, N7, с. 46—48, 1983.
13. Byland G. B., Snyder S. J. *Mol. Pharmacol.*, v. 12, p. 568—575, 1976.
14. Bilezikian J. P., Dornfeld A. M., Gammon D. E. *Biochem. Pharmacol.*, v. 27 p. 1445—1454, 1978.
15. Newman M. E., Solomon H., Lerer B. J. *Neurochem.* v. 46, p. 1667—1669, 1986
16. Valdman A. V., Rozhants V. V. In: *Receptors and Biotechnological Approaches* (ed. by M. E. Vartanjan), p. 62—81, University Press, 1988.
17. Bakardjeva A., Galla H., Helmerich E. *Biochemistry*, v. 18, p. 3016—3023, 1979
18. Рожанец В. В., Чахбра К. К., Данчев Н. Д. и др. — Бюл. экспер. биол., N1, с. 40—42, 1986.

Поступила 20.XII.1989