



УДК 577.151:612.128

КЛЮЧОВІ ПОКАЗНИКИ ШЛЯХУ БІОСИНТЕЗУ СЕРОТОНІНУ В МОЗКУ ЩУРІВ ЗА УМОВ ХРОНІЧНОЇ ДІЇ АЛКОГОЛЮ

В. В. Конопельнюк, В. В. Войтенко, О. М. Савчук, Л. І. Остапченко

*Київський національний університет імені Тараса Шевченка
вул. Володимирська, 64, Київ 01601, Україна
e-mail: konopelnyuk@rambler.ru*

Досліджено ключові показники шляху біосинтезу серотоніну в головному мозку щурів за умов експериментальної хронічної алкогольної інтоксикації. Встановлено зростання вмісту триптофану в мозку щурів протягом усього періоду розвитку хронічної алкогольної інтоксикації. У період абстинентного синдрому показано зниження вмісту триптофану порівняно з його значеннями в період введення спиртового розчину. Показано підвищення активності, ключового та швидкість лімітуючого ферменту шляху біосинтезу серотоніну – триптофан-гідроксилази, в головному мозку щурів на більш пізніх етапах експериментальної хронічної алкогольної інтоксикації. Вміст серотоніну в головному мозку щурів знижувався протягом усього періоду розвитку хронічної алкогольної інтоксикації. На 11-ту добу введення 30% розчину етанолу та в період абстинентного синдрому спостерігалось зростання моноаміноксигеназної активності – ферменту, що забезпечує процес деградації 5-гідрокситриптаміну. Одержані результати вказують на залучення серотонінергічної нейротрансмітерної системи головного мозку в розвиток патогенезу хронічної алкогольної інтоксикації у щурів.

Ключові слова: серотонін, триптофан, хронічна алкогольна інтоксикація.

ВСТУП

За останні десятиліття в Україні різко зросло вживання алкоголю, що створює реальну загрозу національній безпеці. Зловживання алкоголем, переростаючи в синдром алкогольної залежності, призводить до ураження практично всіх систем організму, значного скорочення тривалості життя, згубно впливає на потомство. Демографічні дані свідчать, що алкоголізм, поряд із серцево-судинними, онкологічними захворюваннями і травмами, є однією з найчастіших причин смертності в сучасному світі [7].

Головним наслідком токсичного впливу та початковими проявами розвитку алкоголізму є порушення функцій нервової системи [8]. Для вищезазначеного захворювання характерний поліморфізм ураження центральної та периферичної нервової системи. Основна дія алкоголю пов'язана з розвитком дефіциту вітамінів і мінералів,

який виникає унаслідок порушення засвоєння їх у шлунково-кишковому тракті. Алкоголізм супроводжується зниженням вмісту й активності гамма-аміномасляної кислоти у тканинах мозку (ГАМК-ергічний фактор) та надлишковою активністю глутамату, що проявляє токсичні ефекти, які викликають збудження ЦНС та її пошкодження (глутаматергічний фактор) [3]. Поруч із основними патогенетичними факторами алкогольного ураження ЦНС існують другорядні причини, а саме: токсичний вплив етанолу та його метаболітів на функції печінки, порушення метаболізму моноамінів і ацетилхоліну, підвищений синтез ароматичних кислот тощо. Зловживання алкоголем також поступово зумовлює зниження швидкості кровообігу, що призводить до порушення гематоенцефалічного бар'єра, до проникнення етанолу в головний мозок та прогресивної загибелі нейронів [9].

Під дією етанолу суттєво порушується функціонування активуючої системи мозку і базової для неї дофамінергічної нейромедіаторної системи (зниження активності дофамінових рецепторів), а саме, порушується обмін дофаміну [5]. Тісно пов'язана зі системою дофаміну опіатна система, яка відіграє важливу роль у формуванні алкоголізму [4], опіатні пептиди як нейромодулятори регулюють кругообіг дофаміну і функції рецепторів, тому опіатна система може бути пусковою щодо дофамінергічної нейромедіаторної системи.

Етанол викликає спустошення запасів НАД^+ , тим самим порушуючи хід важливих біохімічних реакцій, у яких бере участь НАД^+ , зокрема реакцій глюконеогенезу, який є головним джерелом живлення для нейронів головного мозку і підтримує енергоутворення у клітинах печінки та нирок [1].

Одним із основних нейромедіаторів є серотонін (5-гідрокситриптамін (5-НТ)), дія якого на загальні нейрони у певній ділянці мозку може істотно впливати на функції мозку, такі як навчання і пам'ять, сприйняття навколишнього середовища, формування настрою та відповіді на вживання етилового спирту [11].

Метою представленої роботи було дослідити зміни вмісту основних метаболітів і ферментів серотонінергічної системи в головному мозку щурів за умов хронічної алкогольної інтоксикації.

МЕТОДИ ТА МАТЕРІАЛИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Досліди проводили на білих нелінійних щурах обох статей масою 160–200 г з дотриманням нормативів Конвенції з біоетики Ради Європи 1997 року, Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментальних та інших наукових цілей, загальних етичних принципів експериментів на тваринах, ухвалених Першим національним конгресом України з біоетики (вересень 2001 року), іншим міжнародних угод і національного законодавства у цій галузі.

Розвиток експериментальної алкогольної інтоксикації у піддослідних тварин відтворювали за методом М.Х. Халілова та Ш.Я. Закихорджаєва [10], з власними модифікаціями, шляхом внутрішньошлункового введення 30% етилового спирту з розрахунку 2 мл на 100 г маси тварини. Контрольну групу становили щури, яким у тому ж віці внутрішньошлунково вводили чисту питну воду, яку використовували для розведення етанолу.

Тварини були розділені на 2 групи: 1 – контрольна група щурів; 2 – група щурів, яким вводили розчин етанолу протягом 11 діб. Для аналізу функціонування серотонінергічної системи відбирали тварин на 1, 3, 7 та 11-ту доби введення спиртового розчину і на 21-шу добу від початку введення етанолу.

Вміст серотоніну і триптофану визначали, використовуючи іонообмінну хроматографію та спектрофлуорометричні методи, описані раніше [6, 16, 19]. Визначення триптофан-гідроксилазної активності проводили згідно з методом D.M. Kuhn [14]. Визначення моноаміноксидазної активності у мозку проводили за методикою, описаною раніше [2]. Визначення даних показників було проведено в гомогенаті головного мозку щурів. Визначення концентрації білка проводили за методом M.M. Bradford [13].

Статистичний аналіз здійснювали за допомогою прикладних програм статистичного аналізу Microsoft Excel. Для оцінки міжгрупових відмінностей застосовували параметричний критерій Стьюдента. Дані представляли у вигляді $M \pm m$ для кожної експериментальної групи. Різницю між показниками вважали статистично значущою при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ І ЇХНЕ ОБГОВОРЕННЯ

Відомо, що субстратом біосинтезу серотоніну є незамінна амінокислота триптофан [12]. Тому першим етапом дослідження функціонування серотонінергічної системи було визначення триптофану в головному мозку щурів. Показано зростання вмісту триптофану в головному мозку щурів протягом усього періоду розвитку хронічної алкогольної інтоксикації (рис. 1).

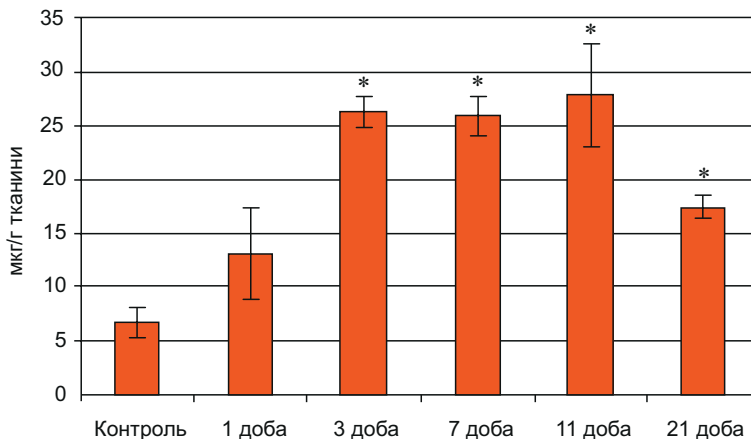


Рис. 1. Вміст триптофану в головному мозку щурів за умов експериментальної хронічної алкогольної інтоксикації ($M \pm m$; $n = 7$);

* – $p \leq 0,05$ порівняно з даними контрольної групи

Fig. 1. Tryptophan content in brain of rats with experimental chronic alcoholic intoxication ($M \pm m$; $n = 7$);

* – $P \leq 0.05$ compared to the control group

На 1, 3, 7 та 11-ту добу спостерігається зростання вмісту даного показника в 1,9, 3,9, 3,8 і 4,1 разу порівняно зі значеннями контрольної групи тварин. У період абстинентного синдрому показано зростання вмісту триптофану у 2,6 разу порівняно з контрольними показниками та його зниження порівняно зі значеннями в період введення спиртового розчину.

Підвищення вмісту триптофану можна пояснити зростанням швидкості його надходження в клітини-мішені, інактивацією альтернативних шляхів метаболізму або зниженням потреб клітини у біосинтезі серотоніну. Дуже мало відомо про

механізми, які лежать в основі процесу захоплення триптофану серотонінергічними нейронами мозку. Є дані, які підтверджують гіпотезу, що у мозку наявний бар'єр між позаклітинним рівнем триптофану та його вмістом усередині нейронів. Триптофан із позаклітинної рідини транспортується до серотонінергічних нейронів за участі неспецифічного мембранного транспортера, який, як припускають, також залучений у транспортування деяких інших нейтральних амінокислот (валін, лейцин, ізолейцин). Тому вміст триптофану в нейронах та інтенсивність його транспортування залежать не тільки від концентрації триптофану, але і від співвідношення концентрацій конкуруючих нейтральних амінокислот до концентрації триптофану. На рівні мембранного транспортера триптофану, залежного від Na^+ , K^+ АТФ-ази, відбувається регуляція синтезу серотоніну. Швидкість захоплення серотоніну пов'язана з циркадними ритмами і регулюється низкою гормонів, наприклад, кортикостероном, який збільшує надходження триптофану.

Досліджено триптофан-гідроксилазну активність як ключового та лімітуючого швидкість ферменту шляху біосинтезу серотоніну [15]. Показано зростання триптофан-гідроксилазної активності в мозку щурів на більш пізніх етапах розвитку хронічної алкогольної інтоксикації (рис. 2).

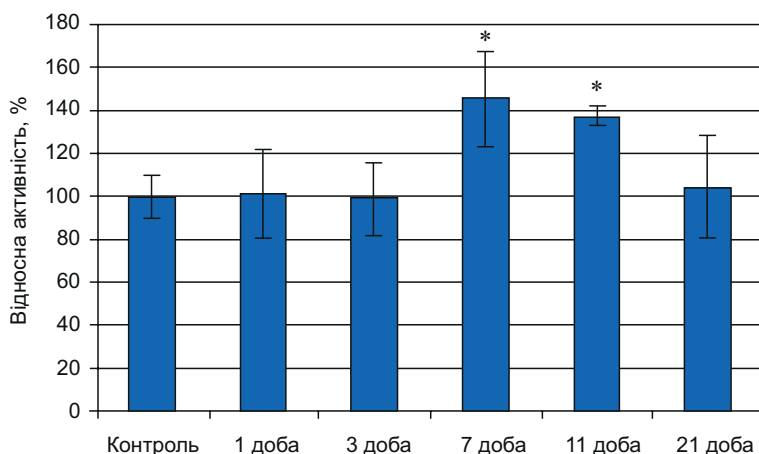


Рис. 2. Триптофан-гідроксилазна активність у головному мозку щурів за умов експериментальної хронічної алкогольної інтоксикації ($M \pm m$; $n = 7$);

* – $p \leq 0,05$ порівняно з даними контрольної групи

Fig. 2. The activity of tryptophanhydroxylase in brain of rats with experimental chronic alcoholic intoxication ($M \pm m$; $n = 7$);

* – $P \leq 0.05$ compared to the control group

На 1-шу і 3-тю добу введення 30% розчину етанолу не спостерігаються зміни триптофан-гідроксилазної активності. Активність підвищувалася на 7-му добу (на 45%) і на 11-ту добу (на 38%) порівняно з показниками контрольної групи тварин. З літературних джерел відомо, що посилення активності триптофан-гідроксилази можливе при стресі, який призводить до вивільнення серотоніну в лобній частці головного мозку, а також завдяки активації серотонін-зв'язуючого білка [18].

Особливості організації серотонінергічної системи та її широкі зв'язки з іншими відділами мозку обумовлюють участь у регуляції багатьох функцій організму.

Алкоголь безпосередньо стимулює вивільнення із внутрішньоклітинних депо нейромедіатора серотоніну в синаптичну щілину, а також ендорфінів, природних речовин, пов'язаних із формуванням алкогольної залежності й потягу випити. Серотонін відіграє важливу роль у вираженні емоцій. У зв'язку з цим особливий інтерес викликає визначення вмісту серотоніну в головному мозку щурів за умов розвитку хронічної алкогольної інтоксикації. Проведені дослідження свідчать про зниження вмісту серотоніну в головному мозку щурів за умов хронічної алкогольної інтоксикації (рис. 3). Введення щурам 30%-ного розчину етанолу призводить до зниження досліджуваного показника в 1,2 разу на 1–11-ту доби. У період абстинентного синдрому спостерігається зниження вмісту серотоніну в 1,3 разу порівняно з показниками контрольної групи тварин.

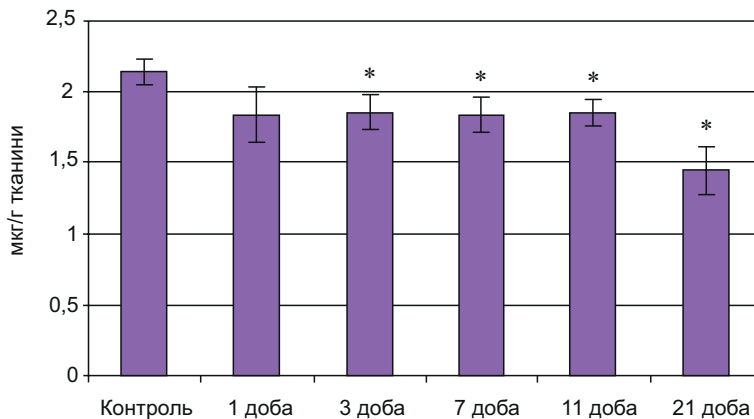


Рис 3. Вміст серотоніну в головному мозку щурів за умов експериментальної хронічної алкогольної інтоксикації ($M \pm m$; $n = 7$);

* – $p \leq 0,05$ порівняно з даними контрольної групи

Fig. 3. Serotonin content in brain of rats with experimental chronic alcoholic intoxication ($M \pm m$; $n = 7$);

* – $P \leq 0.05$ compared to the control group

Підвищення рівня триптофану в мозку призводить до синтезу серотоніну, оскільки у нормі основний фермент триптофан-гідроксилаза є лише напівнасиченим субстратом, тому підвищення триптофану автоматично мало би приводити до підвищення синтезу серотоніну в головному мозку. Нами показано зниження вмісту серотоніну в головному мозку щурів за умов хронічної алкогольної інтоксикації порівняно з контрольною групою. Це може бути пов'язане зі зменшенням запасів серотоніну при даній патології; зменшенням синтезу внаслідок порушення метаболічних процесів, які спрямовані на підтримання фізіологічного рівня серотоніну в організмі; посиленням використання серотоніну у шляхах його катаболізму; порушенням функцій регуляторних структур головного мозку.

Процес розщеплення 5-гідрокситриптаміну забезпечує моноаміноксидаза [17]. Визначення активності даного ферменту показало зміни моноаміноксигеназної активності протягом 1, 3 та 7-ї діб розвитку хронічної алкогольної інтоксикації (рис. 4). На 11-ту добу введення розчину етанолу та в період абстинентного синдрому спостерігається зростання моноаміноксигеназної активності на 13 і 18% порівняно з показниками контрольної групи тварин.

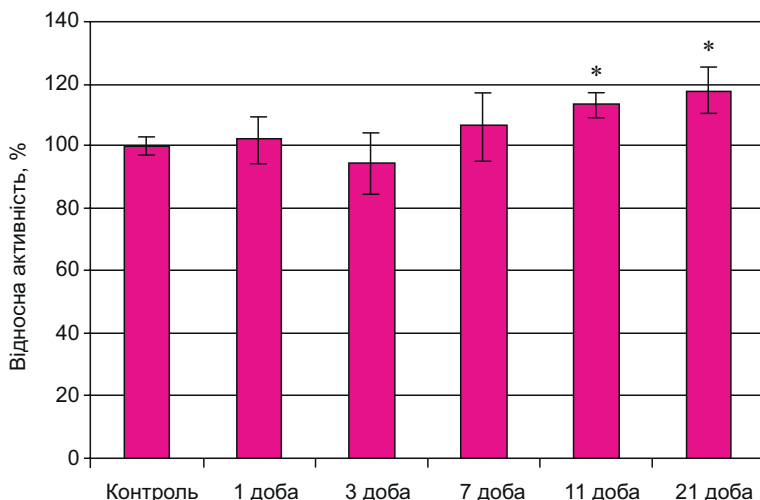


Рис 4. Моноамінооксидазна активність у головному мозку щурів за умов експериментальної хронічної алкогольної інтоксикації ($M \pm m$; $n = 7$);

* – $p \leq 0,05$ порівняно з даними контрольної групи

Fig. 4. The activity of monoaminooxydase in brain of rats with experimental chronic alcoholic intoxication ($M \pm m$; $n = 7$);

* – $P \leq 0.05$ compared to the control group

Таким чином, у результаті проведених досліджень нами встановлені порушення показників шляху біосинтезу серотоніну в головному мозку щурів за умов розвитку хронічної алкогольної інтоксикації. Показано зниження вмісту серотоніну та підвищення вмісту триптофану протягом усього періоду розвитку хронічної алкогольної інтоксикації. Встановлено зростання триптофан-гідроксилазної та моноамінооксидазної активності у більш пізній період введення етанолу. Це може свідчити про залучення серотонінергічної нейротрансмітерної системи у розвиток хронічної алкогольної інтоксикації.

1. Афанасьев В.В., Рубитель Л.Т., Афанасьев А.В. **Острая интоксикация этиловым алкоголем.** СПб, 2002. С. 9–22.
2. Балаклеевский А.И. Колориметрический способ определения активности моноаминоксидазы в сыворотке крови. **Лабораторное дело**, 1976; 3: 151–152.
3. Битейский В.С. Клинико-патогенетические аспекты алкоголизма и наркомании. **Вісник психіатрії та психофармакотерапії**, 2007; 1(11): 7–11.
4. Битенский В.С., Мельник Э.В., Сушко В.В. и др. Нарушения процессов нейрорецепции при алкоголизме и наркоманиях и их коррекция. **Архив психиатрии**, 1998; 2(3): 169–175.
5. Векшина Н.Л., Веретинская А.Г., Бондаренко Т.Т. и др. Нейромедиаторные системы в механизмах ремиссии и рецидива при алкоголизме. **Експеримент. и клин. фармакология**, 1995; 58(5): 62–64.
6. Максименко Е.Г., Савченко В.Н. Уровень триптофана и серотонина в условиях судорожной активности головного мозга. **Вісник Харків. нац. ун-ту ім. В.Н. Каразіна. Медицина**, 2000; 1(494): 40–43.

7. Меркулова О.Ю., Єфремова Т.П., Кривошапова О.І. та ін. Хронічний алкоголізм – соціальна та медична проблема сучасності. **Медицина транспорту України**, 2011; 3: 104–111.
8. Минко А.И. Алкоголізм – междисциплинарная проблема (выявление, лечение, реабилитация, профилактика). **Укр. вісник психоневрології**, 2001; 9 (4): 6–7.
9. Нужный В.П. **Механизмы и клинические проявления токсического действия алкоголя**: руководство по наркологии / под ред. чл.-корр. РАМН проф. Н. Н. Иванца. М.: Медпрактика, 2002; 1: С. 74–93.
10. Халилов М.Х., Закиходжаев Ш.Я. К характеристике некоторых патохимических сдвигов в крови, тканях печени и головного мозга при экспериментальной алкогольной интоксикации. **Вопросы клиники алкоголизма**: сб. науч. трудов. Ташкент, 1983: С. 38–41.
11. Черемской А.П. Механизмы повреждения головного мозга при алкогольном делирии. **Вісник морської медицини**, 2000; 2(10): 34–38.
12. Шток В.Н. **Фармакотерапия в неврологии**: практ. руководство. М., 2003. 301 с.
13. Bradford M.M. *Analyt. Biochem*, 1976; 72: 248–254.
14. Kuhn D.M., O'Callaghan J.P., Juskevich J. et al. Activation of brain tryptophan hydroxylase by ATP-Mg²⁺: Dependence on calmodulin. **Biochemistry**, 1980; 77: 4688–4691.
15. Eddahibi S., Adnot S. The serotonin pathway in pulmonary hypertension. **Arch. Mai. Coeur. Vaiss**, 2006; 99: 621–625.
16. Gaitonde M.K. A fluorimetric method for the determination of tryptophan in animal tissues. **Biochem. S**, 1974; 139: 625–631.
17. Gaspar P., Cases O., Maroteux L. The developmental role of serotonin: news from mouse molecular genetics. **Nature**, 2003; 4: 1002–1012.
18. Walther D.J. Synthesis of serotonin by a second tryptophan hydroxylase isoform. **Science**, 2003; 299(5603): 76–82.
19. Weissbach H., T. Philip Waalkes, S. Udenfriend. A simplified method for measuring serotonin in tissue; simultaneous assay of both serotonin and histamine. **J. Biol. Chem**, 1957; 230(2): 865–71.

KEY INDICATORS OF SEROTONIN SYNTHESIS IN RAT BRAIN UNDER CHRONIC ALCOHOL EFFECT

V. V. Konopelnyuk, V. V. Voitenko, O. M. Savchuk, L. I. Ostapchenko

Taras Shevchenko Kyiv National Unaversity, 64, Volodymyrska St., Kyiv 01601, Ukraine

Key indicators of serotonin synthesis in the brain of rats with experimental chronic alcohol intoxication were investigated. Content of tryptophan in rat brain during the period of chronic alcohol intoxication was increased. During withdrawal symptoms, a reduction in tryptophan content in comparison with its value during the administration of alcohol solution was shown. An increased activity, a key and rate limiting enzyme of serotonin biosynthesis path – tryptophan-hydroxylase in rat brain at later stages of experimental chronic alcohol intoxication was shown. Serotonin content in rat brain decreased during the period of chronic alcohol intoxication. At the 11th day of administration of 30% solution of ethanol and during the withdrawal syndrome, growth of monoaminoxigenase activity – enzyme that controls the degradation of 5-hydroxytryptamine – was shown. These results suggest the involvement of serotonergic neurotransmitter systems in pathogenesis of brain development at chronic alcohol intoxication in rats.

Keywords: serotonin, tryptophan, chronic alcohol intoxication.

КЛЮЧЕВЫЕ ПОКАЗАТЕЛИ ПУТИ БИОСИНТЕЗА СЕРТОНИНА В МОЗГЕ КРЫС ПРИ УСЛОВИИ ХРОНИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ АЛКОГОЛЯ

В. В. Конопельнюк, В. В. Войтенко, А. Н. Савчук, Л. І. Остапченко

*Киевский национальный университет имени Тараса Шевченко
ул. Владимирская, 64, Киев 01601, Украина*

Исследованы ключевые показатели пути биосинтеза серотонина в головном мозге крыс в условиях экспериментальной хронической алкогольной интоксикации. Установлен рост содержания триптофана в мозге крыс в течение всего периода развития хронической алкогольной интоксикации. В период абстинентного синдрома показано снижение содержания триптофана в сравнении с его значениями в период введения спиртового раствора. Показано повышение активности, ключевого и скорость лимитирующего фермента пути биосинтеза серотонина – триптофан-гидроксилазы, в головном мозге крыс на более поздних этапах экспериментальной хронической алкогольной интоксикации. Содержание серотонина в головном мозге крыс снижалось в течение всего периода развития хронической алкогольной интоксикации. На 11-е сутки введения 30% раствора этанола и в период абстинентного синдрома наблюдался рост моноаминоксигеназной активности – фермента, обеспечивающего процесс деградации 5-гидрокситриптамина. Полученные результаты указывают на привлечение серотонинергической нейротрансмиттерной системы головного мозга в развитие патогенеза хронической алкогольной интоксикации у крыс.

Ключевые слова: серотонин, триптофан, хроническая алкогольная интоксикация.

Одержано: 29.10.2012