

**НАЦИОНАЛЬНАЯ АКАДЕМИЯ НАУК БЕЛАРУСИ  
ИНСТИТУТ БИОХИМИИ**

УДК (547.262:577.175.82):616.89-008.441.13

**Оганесян Николай Андраникович**

**ПУРИНЕРГИЧЕСКИЕ И ХОЛИНЕРГИЧЕСКИЕ  
МЕХАНИЗМЫ УСТОЙЧИВОСТИ К НАРКОТИЧЕСКОМУ  
ДЕЙСТВИЮ ЭТАНОЛА**

03.00.04 - биохимия

**АВТОРЕФЕРАТ**

**диссертация на соискание ученой степени  
кандидата медицинских наук**

**Гродно 2003**

Работа выполнена на курсе клинической биохимии ГВУУ «Гродненский государственный медицинский университет».

**Научный руководитель:**

кандидат биологических наук, доцент Киселевский Ю.В. Кафедра реаниматологии и анестезиологии с курсом клинической биохимии ГВУУ «Гродненский государственный медицинский университет»

**Научный консультант:**

доктор медицинских наук, профессор Лелевич В.В. Институт биохимии НАН Беларуси, кафедра биохимии ГВУУ «Гродненский государственный медицинский университет»

**Официальные оппоненты:**

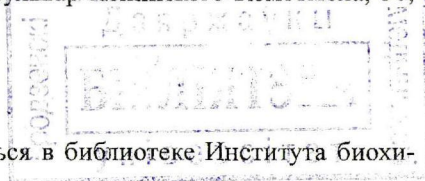
доктор медицинских наук, профессор Камышников В.С. Белорусская медицинская академия последипломного образования.

доктор биологических наук, профессор Буко В.У. Институт биохимии НАН Беларуси, лаборатория экспериментальной гепатологии.

**Оппонирующая организация:**

ГВВУУ «Белорусский государственный медицинский университет», г. Минск

Защита состоится « 13 » октября 2003 в \_\_\_ часов на заседании Совета по защите диссертаций Д 01.30.01 при Институте биохимии НАН Беларуси по адресу: 230017 г. Гродно, бульвар Ленинского Комсомола, 50, тел. 33-41-21



С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института биохимии НАН Беларуси

Автореферат разослан « 11 » сентября 2003 г.

Ученый секретарь Совета по защите диссертаций,  
кандидат биологических наук

 П.С. Пронько

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ.

### Актуальность темы.

Алкоголизм относится к числу заболеваний, имеющих высокую социальную значимость. Медицинские последствия данного заболевания сопоставимы с потерями от злокачественных и сердечно-сосудистых заболеваний. Около 20% населения во всем мире злоупотребляют алкоголем или страдают алкоголизмом [Devaud L., et 1999].

Злоупотребление этиловым алкоголем приводит к развитию устойчивости (толерантности) к его эффектам на организм и в последующем к возникновению алкоголизма [Tabakoff B., et al., 1988]. Толерантность является связующим звеном между феноменом предпочтения этанола и формированием алкогольной зависимости. Выяснение механизмов развития этого явления позволит разработать эффективные методы коррекции уже на начальных этапах развития алкоголизма.

В результате многочисленных исследований было продемонстрировано, что устойчивость к эффектам этанола формируют различные нейрональные факторы, такие как вазопрессин и аденилатциклазная система, нейромедиаторы, возбуждающие аминокислоты, а также изменения свойств липидного бислоя и регуляторных белков плазматической мембраны [Gorids et al., 1990, Diamond I., 1997].

В то же время очень мало исследований посвящено роли ацетата – прямого продукта метаболизма этанола – в развитии алкогольной болезни. Как известно, образующийся из этанола ацетальдегид более чем на 95% метаболизируется в ацетат, и содержание этой жирной кислоты в крови увеличивается в несколько раз после введения этанола [Carmichael F.J., et al 1991]. Поскольку ацетат является эндогенным и малотоксичным веществом, роль этого соединения в развитии алкоголизма считали малозначимой. Однако, целый ряд исследований, появившихся в научной литературе за последние 3-5 лет, свидетельствовал об обратном. К настоящему времени существует много доказательств того, что часть центральных эффектов этанола обусловлена действием именно ацетата [Israel Y., 1994]. Ацетат активируется до ацетил-КоА, который является универсальным прекурсором при генерировании метаболической энергии в цикле Кребса. Кроме того, ацетил-КоА в нервной ткани служит прекурсором для синтеза ацетилхолина – нейротрансмиттера, отвечающего за механизмы памяти, способность к обучению и др. С другой стороны, в ходе ацетил-КоА-синтетазной реакции используется энергия АТФ, и образуются эквимолярные количества АМФ. Последний, в свою очередь, является основным источником аденозина, роль которого в центральных эффектах этанола широко обсуждается в литературе [Phillis J.W., et al., 1992; Meng Z.H., et al., 1995].

На сегодняшний день пути утилизации ацетата при употреблении больших количеств этилового алкоголя остаются практически не изученными. Нерешенным остается вопрос о влиянии избытка ацетата, образующегося при биотрансформации поступающего в организм экзогенного этанола, на пул ацетил-КоА в митохондриях и нервных окончаниях. Отсутствуют сведения о возможности использования ацетата для образования ацетилхолина в ацетилхолинтрансферазной реакции и, таким образом, воздействия на холинергическую нейротрансмиссию. Остается неясным механизм ацетат-индуцируемого изменения пула пуриновых нуклеотидов и участие этих превращений в метаболических и рецепторных механизмах развития устойчивости к действию алкоголя.

Выяснение роли изменений в системе функционирования холинергической нейромедиации головного мозга в процессе развития устойчивости к действию этанола, установление взаимосвязи между состоянием холинергической системы и метаболизмом пуринов в условиях алкоголизации дадут возможность дополнить теоретическую основу для определения новых подходов диагностики и контроля при злоупотреблении алкоголем, а также, возможно, позволят определить направление эффективной стратегии фармакологической терапии алкоголизма.

**Связь с крупными научными программами, темами.** Диссертация выполнялась в рамках Республиканской программы «Холинергические и пуринергические механизмы толерантности к алкоголю» (№ гос. регистрации 2001.490). Часть настоящей работы выполнялась в рамках гранта Комитета по Научным Исследованиям Республики Польша (грант № 6 P04A 013 10), гранта Гданьской медицинской академии Республики Польша (Проект W-113). Часть исследований также выполнена на базе кафедры фармакологии Ягеллонского Университета Республики Польша в рамках договора о сотрудничестве между Гродненским государственным медицинским университетом и Медицинским Колледжем Ягеллонского университета в Кракове.

**Цель работы.** Целью настоящей работы является выяснение роли аденозина в модуляции холинергической активности центральной нервной системы при формировании устойчивости к наркотическому действию этанола.

**Основные задачи исследования.**

1. Оценить региональный профиль ацетата, ацетил-КоА и метаболитов пуринового ряда в мозге крыс при развитии устойчивости к наркотическому действию этанола.
2. Исследовать активность ферментов обмена ацетата, ацетил-КоА, аденозина в различных структурах мозга крыс в экспериментальных условиях, приводящих к снижению чувствительности к наркотическому эффекту этанола.

3. Изучить особенности функционирования синаптосомальной системы биосинтеза ацетилхолина и освобождения его нейротрансмиттерного пула при формировании устойчивости к наркотическому действию этанола.
4. Установить ацетат-индуцированные изменения в синаптосомальной системе биосинтеза и освобождения ацетилхолина, а также в содержании аденозина при снижении продолжительности посталкогольного наркоза.
5. Определить характер модуляторного действия аденозина на холинергическую нейротрансмиссию и его роль в механизме развития устойчивости к наркотическому действию этанола.

**Объект и предмет исследования.** В качестве предмета исследования были выбраны концентрации ацетата, ацетил-КоА, аденозина и других пуриновых метаболитов, показатели активности ферментов метаболизма ацетата, ацетил-КоА и пуринов. Исследовались также основные этапы биосинтеза ацетилхолина и уровень высвобождения ацетилхолина и аденозина из нервных окончаний. Объектом исследования служили регионы и субклеточные фракции (синаптосомы и митохондрии) мозга крыс.

**Гипотеза.** Предполагается наличие причинно-следственных взаимосвязей между развитием устойчивости к действию этанола и ацетат-индуцированными изменениями в метаболизме пуринов, а также в функциональном состоянии холинергической системы головного мозга. Кроме того, предполагаются адаптивные изменения в чувствительности аденозиновых рецепторов. Данные изменения в функционировании пуринергической системы при интенсивной и длительной нагрузке этанолом, вероятно, сопровождаются модуляцией холинергической нейротрансмиссии, что может быть связано с развитием устойчивости к центральным эффектам этанола.

**Методология и методы проведенного исследования.** Для решения поставленных задач использован комплексный подход, основанный на изучении ряда показателей как на уровне гомогенатов, так и субклеточных фракций (синаптосом и митохондрий). В работе использовались спектрофотометрические, радиометрические, люцинометрические методы, а также методы газовой и высокоэффективной жидкостной хроматографии.

**Научная новизна работы.** В работе впервые проведено комплексное изучение роли изменений метаболизма ацетилхолина и функционального взаимодействия холинергической и пуринергической нейротрансмиссии головного мозга в механизмах формирования устойчивости к наркотическому действию этанола. Впервые приведены данные о влиянии потребления этанола на уровень ацетата в различных регионах мозга. Новыми являются данные об эффектах алкогольной нагрузки на метаболизм пуринов в различных отделах мозга. Получены новые данные, касающиеся состояния метаболизма ацетилхолина в нервных окончаниях коры головного мозга крыс в условиях форми-

дольности устойчивости к наркотическому действию этанола, причем используемые нами методы субклеточного фракционирования позволили оценить основные этапы синтеза ацетилхолина (образование ацетил-КоА из пирувата, цитратный механизм транспорта, непосредственно синтез ацетилхолина в ацетилхолинтрансферазной реакции).

При помощи использования селективных агонистов рецепторов аденозина нами впервые установлена роль пуринергической модуляции холинергической нейротрансмиссии в механизмах формирования устойчивости к наркотическому эффекту этанола.

### **Практическая значимость полученных результатов.**

Результаты и выводы представленной диссертации, наряду с теоретическим и фундаментальным характером, имеют практическую значимость.

Данные, полученные в результате выполнения настоящей работы, позволяют:

- 1) систематизировать взгляды на адаптацию метаболических процессов в центральной нервной системе при формировании устойчивости к этанолу;
- 2) оценить роль изменений в системе функционирования холинергической нейромедиации головного мозга при развитии устойчивости к действию этанола;
- 3) установить взаимосвязь между состоянием холинергической системы и метаболизмом пуринов в условиях алкоголизации.

Предполагается, что полученные результаты послужат основой для разработки успешной фармакологической стратегии лечения алкоголизма с использованием фармакологических средств, влияющих на пуринергический рецепторный аппарат, либо на активность холинергической системы.

### **Основные положения, выносимые на защиту.**

1. Устойчивость к наркотическому действию этанола, которая развивается в процессе семидневной алкогольной нагрузки (3,5 г/кг/сут, в/бр), сопровождается накоплением ацетата в ткани мозга и активацией его утилизации преимущественно в коре больших полушарий.
2. Семидневная алкогольная нагрузка (3,5 г/кг/сут, в/бр) приводит к активации метаболизма пуринов и накоплению аденозина избирательно в ткани коры больших полушарий головного мозга, а также снижению чувствительности  $A_1$ -пуринергических рецепторов кортикальных синапсов.
3. Патогенетически значимым механизмом развития устойчивости к наркотическому действию этанола представляется увеличение кортикальной холинергической активности на фоне снижения нейроингибиторного действия аденозина.

**Личный вклад соискателя.** Автор принимал непосредственное участие в выполнении исследований по всем разделам диссертации, включая разработку методических подходов, организацию и проведение экспериментов, статистическую обработку полученных данных, аналитический обзор литературы,

обобщение и анализ результатов исследований. Научный руководитель помогал в разработке стратегии исследований, постановке целей и задач. Научный консультант оказывал помощь в обсуждении и трактовке экспериментальных данных.

**Апробация работы.** Результаты исследований представлялись и обсуждались на следующих научных форумах:

- Вторая Нейрохимическая Конференция. Варшава, Польша, 1994 г.
- Девятый Международный симпозиум «Холинергические механизмы». Маинз, Германия, 1995 г.
- Восьмой Конгресс Европейского общества биомедицинских исследований алкоголизма (ESBRA). Париж, Франция, 2001 г.
- Гродненская областная конференция молодых ученых. Гродно, 2001 г.
- Первая Российско-Белорусская конференция «Медицинские и социально-психологические проблемы алкогольной зависимости». Витебск, 2002 г.
- Конференция, посвященная 200-летию узловой клинической больницы г. Гродно «Актуальные вопросы современной медицины». Гродно, 2002 г.
- Шестой Республиканский съезд специалистов клинической лабораторной диагностики Республики Беларусь. Брест, 2002 г.

**Публикации.** По теме диссертации опубликовано 12 печатных работ, из которых 7 статей (3 опубликованы в научных журналах, 4 – в республиканских сборниках научных трудов), 5 тезисов докладов на конференциях и симпозиумах (4 – в материалах международных конференций, 1 – в республиканских). Общее количество страниц опубликованных материалов – 28.

**Структура и объем диссертации.** Диссертация состоит из введения, общей характеристики работы, обзора литературы, описания методов исследования, 2-х глав изложения результатов собственных исследований и их обсуждения, обобщения полученных результатов, заключения и указателя литературы, включающего 13 работ на русском языке и 216 работ на английском языке. Диссертация изложена на 103 страницах машинописного текста, содержит 15 таблиц, 12 рисунков.

## **ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ.**

**Материалы и методы исследований.** В экспериментах использовались белые крысы самцы массой 120-180 г породы Wistar, содержащиеся на стандартном рационе вивария. Животных тестировали по продолжительности этанол-индуцированного сна после введения внутривенно 20% этанола в дозе 3,5 г/кг массы тела. В результате тестирования отобрана группа животных, однородных по продолжительности наркотического эффекта этанола (время сна  $114 \pm 15$  мин.), наиболее полно представляющая популяцию (75% от общей популяции). Для тестирования было использовано 803 крысы.

исследования устойчивости к наркотическому действию этанола, причем используемые нами методы субклеточного фракционирования позволили оценить основные этапы синтеза ацетилхолина (образование ацетил-КоА из пирувата, цитратный механизм транспорта, непосредственно синтез ацетилхолина в ацетилхолинтрансферазной реакции).

При помощи использования селективных агонистов рецепторов аденозина нами впервые установлена роль пуринергической модуляции холинергической нейротрансмиссии в механизмах формирования устойчивости к наркотическому эффекту этанола.

### **Практическая значимость полученных результатов.**

Результаты и выводы представленной диссертации, наряду с теоретическим и фундаментальным характером, имеют практическую значимость. Данные, полученные в результате выполнения настоящей работы, позволяют: 1) систематизировать взгляды на адаптацию метаболических процессов в центральной нервной системе при формировании устойчивости к этанолу; 2) оценить роль изменений в системе функционирования холинергической нейромедиации головного мозга при развитии устойчивости к действию этанола; 3) установить взаимосвязь между состоянием холинергической системы и метаболизмом пуринов в условиях алкоголизации.

Предполагается, что полученные результаты послужат основой для разработки успешной фармакологической стратегии лечения алкоголизма с использованием фармакологических средств, влияющих на пуринергический рецепторный аппарат, либо на активность холинергической системы.

### **Основные положения, выносимые на защиту.**

1. Устойчивость к наркотическому действию этанола, которая развивается в процессе семидневной алкогольной нагрузки (3,5 г/кг/сут, в/бр), сопровождается накоплением ацетата в ткани мозга и активацией его утилизации преимущественно в коре больших полушарий.
2. Семидневная алкогольная нагрузка (3,5 г/кг/сут, в/бр) приводит к активации метаболизма пуринов и накоплению аденозина избирательно в ткани коры больших полушарий головного мозга, а также снижению чувствительности  $A_1$ -пуринергических рецепторов кортикальных синапсов.
3. Патогенетически значимым механизмом развития устойчивости к наркотическому действию этанола представляется увеличение кортикальной холинергической активности на фоне снижения нейроингибиторного действия аденозина.

**Личный вклад соискателя.** Автор принимал непосредственное участие в выполнении исследований по всем разделам диссертации, включая разработку методических подходов, организацию и проведение экспериментов, статистическую обработку полученных данных, аналитический обзор литературы,



обобщение и анализ результатов исследований. Научный руководитель помогал в разработке стратегии исследований, постановке целей и задач. Научный консультант оказывал помощь в обсуждении и трактовке экспериментальных данных.

**Апробация работы.** Результаты исследований представлялись и обсуждались на следующих научных форумах:

- Вторая Нейрохимическая Конференция. Варшава, Польша, 1994 г.
- Девятый Международный симпозиум «Холинергические механизмы». Маинз, Германия, 1995 г.
- Восьмой Конгресс Европейского общества биомедицинских исследований алкоголизма (ESBRA). Париж, Франция, 2001 г.
- Гродненская областная конференция молодых ученых. Гродно, 2001 г.
- Первая Российско-Белорусская конференция «Медицинские и социально-психологические проблемы алкогольной зависимости». Витебск, 2002 г.
- Конференция, посвященная 200-летию узловой клинической больницы г. Гродно «Актуальные вопросы современной медицины». Гродно, 2002 г.
- Шестой Республиканский съезд специалистов клинической лабораторной диагностики Республики Беларусь. Брест, 2002 г.

**Публикации.** По теме диссертации опубликовано 12 печатных работ, из которых 7 статей (3 опубликованы в научных журналах, 4 – в республиканских сборниках научных трудов), 5 тезисов докладов на конференциях и симпозиумах (4 – в материалах международных конференций, 1 – в республиканских). Общее количество страниц опубликованных материалов – 28.

**Структура и объем диссертации.** Диссертация состоит из введения, общей характеристики работы, обзора литературы, описания методов исследования, 2-х глав изложения результатов собственных исследований и их обсуждения, обобщения полученных результатов, заключения и указателя литературы, включающего 13 работ на русском языке и 216 работ на английском языке. Диссертация изложена на 103 страницах машинописного текста, содержит 15 таблиц, 12 рисунков.

## **ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ.**

**Материалы и методы исследований.** В экспериментах использовались белые крысы самцы массой 120-180 г породы Wistar, содержавшиеся на стандартном рационе вивария. Животных тестировали по продолжительности этанол-индуцированного сна после введения внутривенно 20% этанола в дозе 3,5 г/кг массы тела. В результате тестирования отобрана группа животных, однородных по продолжительности наркотического эффекта этанола (время сна  $114 \pm 15$  мин.), наиболее полно представляющая популяцию (75% от общей популяции). Для тестирования было использовано 803 крысы.

Непосредственно в экспериментах было использовано 230 животных. Устойчивость к наркотическому эффекту этанола моделировали путем ежедневно-го внутривентриального введения раствора этанола в дозе 3,5 г/кг/сут в течение 7-ми дней [Буров Ю.В. Ведерникова, 1985]. Критерием снижения чувствительности служило уменьшение времени сна под воздействием этанола. Были сформированы четыре группы животных: (1) Контрольная группа животных – 8 дней в/бр 0,89% NaCl (последнее введение за час до забоя). Далее в рисунках и таблицах данная группа обозначалась как «Контроль». (2) Группа крыс, подвергнутых острому алкогольному воздействию – 7 дней 0,9% NaCl, в/бр/сут, за час до забоя 20% р-р этанола, 3,5 г/кг массы тела в/бр. Далее в рисунках и таблицах данная группа обозначалась как «О.Э.». (3) Группа крыс со сформированной устойчивостью к наркотическому действию этанола – 7 дней 20% р-р этанола в дозе 3,5 г/кг/сут (последнее введение за 24 часа до забоя), за час до забоя 0,9% NaCl, в/бр. Далее в рисунках и таблицах данная группа обозначалась как «7дн.Э.». (4) Группа крыс, подвергнутых острому алкогольному воздействию на фоне предварительной семидневной алкоголизации – 8 дней 20% р-р этанола в дозе 3,5 г/кг/сут (последнее введение за час до забоя). Далее в рисунках и таблицах данная группа обозначалась как «7дн.Э+О.Э.».

Забой животных проводили посредством декапитации. На льду из мозга выделяли: фронтальную кору, боковую кору, стриатум, гипоталамус, продолговатый мозг.

В гомогенатах отделов мозга определяли: 1) активность пируватдегидрогеназы (КФ 1.2.4.1.), ацетил-КоА синтетазы (КФ 4.1.3.8.) [Szutowicz A., et al., 1981], 5'-нуклеотидазы (КФ 3.1.3.5.) [Bergmeyer HU, 1984], аденозиндеаминазы (КФ 3.5.4.4.) [Bota A., et al., 2000.]; 2) уровень ацетил-КоА [Szutowicz A., et al., 1987]; 3) концентрацию ацетата методом газовой хроматографии с помощью газового хроматографа HP6890 (США) [Giles H.G., et al., 1986.]; 4) концентрацию метаболитов пуринового ряда (пул АМФ/АДФ, аденозин, инозин, гипоксантин, ксантин и мочевая кислота) методом высокоэффективной жидкостной хроматографии на жидкостном хроматографе ВЕКМАН Gold System (США) [Betto P., et al. 1994].

Первые окончания и митохондрии клеток глии и нейронов из коры головного мозга крыс выделяли с использованием метода дифференциального центрифугирования в градиенте фикола и сахарозы [Szutowicz A. et al., 1982]. В синаптосомальной фракции определяли активность пируватдегидрогеназы, ацетил-КоА синтетазы [Szutowicz A., et al., 1981], АТФ цитратлиазы (КФ 4.1.3.8.) [Yip V., et al., 1991], холинацетилтрансферазы (КФ 2.3.1.6.) [Fonnum F., 1975]. В митохондриальной фракции определяли активность ацетил-КоА синтетазы и пируватдегидрогеназы. Проводили инкубацию нервных оконча-

ний в течение 30 минут в среде с пируватом или ацетатом. В инкубационной среде затем определяли уровень пирувата [Rossenberg J.C., et al., 1966], цитрата [Daely S., 1965], аденозина [Kather H., et al., 1987.] и ацетилхолина [Rigny J., et al., 1986]. В синапсосамах определяли уровень ацетил-КоА и аденозина. Кроме того, из митохондрий клеток глии и нейронов, а также синапсосомальных митохондрий производили частичную очистку пируватдегидрогеназного комплекса. Полученный из нервных окончаний и несинапсосомальных митохондрий препарат ПДК использовали в дальнейшем для определения основных кинетических констант.

Для оценки достоверности различий использовали методы параметрической статистики ANOVA однофакторного анализа и тест Стьюдента с определением t-критерия, различия считали достоверными при  $p < 0,05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.

**Региональные особенности метаболизма ацетата и пуриновых производных в головном мозге крыс в процессе адаптации к действию этанола.**

Эндогенный уровень ацетата в мозге крыс составил в среднем 0,38 мМоль. Не было обнаружено существенной разницы в концентрации этого метаболита между исследуемыми регионами мозга (табл. 1).

Таблица 1.

**Концентрация ацетата (мМоль/г ткани) в головном мозге крыс со сформированной устойчивостью к наркотическому действию этанола, а также на фоне острой алкогольной интоксикации (3,5 г/кг, в/бр) (n=7, M±S.E.M.).**

Регион мозга	Группа			
	Контроль	О.Эт	7дн. Эт	7дн.Эт+О.Эт.
Лобная кора	0,34±0,06	1,06±0,13 <sup>+</sup>	0,61±0,05*	1,21±0,07 <sup>+</sup>
Боковая кора	0,38 ±0,07	0,93±0,17 <sup>+</sup>	0,49±0,06	0,99±0,1 <sup>+</sup>
Гипоталамус	0,37 ±0,04	0,48±0,04 <sup>+</sup>	0,56 ±0,05*	0,625±0,05 <sup>+</sup>
Стриатум	0,46 ± 0,05	0,88 ±0,08 <sup>+</sup>	0,54±0,03	0,97 ±0,07 <sup>+</sup>
Продолговатый мозг	0,34 ± 0,05	0,48 ± 0,07 <sup>+</sup>	0,51±0,05*	0,63 ± 0,08

Примечание: здесь и во всех последующих таблицах и рисунках: Контроль – контрольная группа (8 дней в/бр раствор 0,9% NaCl), О.Эт – группа крыс, подвергнутая острой нагрузке этанолом (за 60 мин до забоя этанол в дозе 3,5 г/кг в/бр), 7дн. Эт – группа крыс со сформированной устойчивостью к наркотическому действию этанола (7 дней этанол 3,5 г/кг, в/бр), 7дн.Эт+О.Эт. группа крыс со сформированной устойчивостью к наркотическому действию этанола на фоне острой нагрузки этанолом (за 60 мин до забоя этанол в дозе 3,5 г/кг в/бр); \* – статистически значимая разница по отношению к контролю ( $p < 0,05$ ), + – статистически значимая разница по отношению к животным без острого алкогольного воздействия ( $p < 0,05$ ).

Через 60 минут после введения этанола у крыс без предварительного контакта с алкоголем отмечалось увеличение уровня ацетата во всех отделах мозга (табл. 1). При этом изменялся региональный профиль ацетата. После острого введения этанола в коре мозга и стриатуме уровень этой жирной кислоты был практически вдвое выше по сравнению с гипоталамусом ( $p < 0,001$ ) и продолговатым мозгом ( $p < 0,001$ ).

Через 24 часа после последнего введения этанола у крыс с семидневной алкоголизацией уровень ацетата был достоверно выше в лобной коре (на 80%,  $p < 0,005$ ), гипоталамусе и продолговатом мозге (на 50%,  $p < 0,001$ ) по сравнению с соответствующими отделами мозга контрольных животных. В боковой коре и стриатуме увеличение этого показателя было статистически не достоверно (табл. 1). В результате острой алкогольной интоксикации кон-

**Таблица 2.**  
Концентрация ацетил-КоА (нМоль/г ткани) и активность основных ферментов его биосинтеза (нМоль/мин/мг белка) в головном мозге крыс со сформированной устойчивостью к наркотическому действию этанола, а также при острой алкогольной интоксикации (3,5 г/кг/в, в/бр) ( $n=6-7$ ,  $M \pm S.E.M.$ ).

Параметр (ед. измерения)	Отдел мозга	Группа			
		Контроль	О.Эт.	7дн. Эт	7дн.Эт+О.Эт.
Ац-КоА	ЛК	79,6±4,6	114±4,7 <sup>o</sup>	88,2±4,3	72±3,4 <sup>o+</sup>
	БК	75±2,8	79,3±4,8	88,5±4,8	87,8±4,7
	Гт	60,2±3,7	62,8±2,7	62,5±5,7	67±6,3
	Стр	64,3±4,5	71,1±4,5	75,3±18,7	90,4±9,2
	П.М.	91,8±6,8	100±7,8	97,3±23,2	91±5,5
Пируватдегидрогеназа	ЛК	16,3±2,5	16,4±3,4	24,7±1,5*	26,1±1,6 <sup>+</sup>
	БК	14,0±1,7	15,2±1,6	16,7±1,6*	17,7±0,7 <sup>+</sup>
	Гт	14,9±1,2	15,2±1,65	16,3±1,75	17,7±1,2
	Стр	15,7±1,8	16,28±2,8	16,6±1,8	18,6±4,3
	П.М.	11,35±2,6	11,8±2,7	9,46±0,9	14,1±2,2
Ац-КоА синтетаза	ЛК	2,49±0,24	3,12±0,3 <sup>o</sup>	3,72±0,2*	3,7±0,22 <sup>+</sup>
	БК	2,62±0,3	2,95±0,2	3,24±0,25*	3,5±0,33 <sup>+</sup>
	Гт	2,45±0,27	2,63±0,36	2,96±0,54	3,24±0,59 <sup>+</sup>
	Стр	2,81±0,22	2,9±0,17	3,16±0,32	3,3±0,15
	П.М.	3,13±0,25	3,28±0,26	3,22±0,17	3,42±0,2

Примечание: 1. ЛК – лобная кора, БК – боковая кора, Гт – гипоталамус, Стр. – стриатум, П.М. – продолговатый мозг, 2. \* – статистически значимая разница по отношению к контролю ( $p < 0,05$ ); <sup>+</sup> – статистически значимая разница по отношению к животным группы О.Э.; <sup>o</sup> – статистически значимая разница по отношению к животным аналогичной группы без острого алкогольного воздействия ( $p < 0,05$ ).

центрация ацетата у животных, устойчивых к наркотическому действию этанола, увеличивалась только в коре мозга и стриатуме. Наиболее вероятной причиной алкоголь-индуцированного увеличения концентрации ацетата в мозге является поступление его с кровью из печени – основного этанол-окисляющего органа.

7-дневная нагрузка этанолом не приводила к значимым изменениям концентрации ацетил-КоА в исследуемых отделах головного мозга (табл. 2). В контрольной группе спустя 60 минут после введения этанола концентрация ацетил-КоА увеличивалась в лобной коре и не изменялась в других отделах головного мозга. В группе животных, устойчивых к наркотическому действию этанола, на фоне острой алкоголизации отмечался обратный эффект – уровень ацетил-КоА уменьшался в лобной коре мозга.

Снижение чувствительности к действию этанола сопровождается активацией путей деградации пуринов в коре мозга. Это проявляется увеличением концентрации АМФ+АДФ и аденозина, ростом активности 5'-нуклеотидазы, а также возрастанием активности аденозиндеаминазы и повышением уровня мочевой кислоты в коре больших полушарий мозга крыс после семи-дневной алкогольной нагрузки (табл. 3).

Таблица 3.

**Эффект 7-дневной алкоголизации и острой нагрузки этанолом на основные параметры метаболизма пуринов в коре больших полушарий головного мозга крыс ( $M \pm S.E.M.$ ,  $n=6$ ).**

Параметр	Группа			
	Контроль	О.Эт.	7дв.Эт	7дв.Эт.+О.Эт.
АДФ + АМФ (мкМоль/г ткани)	2,1±0,27	2,8±0,3*	2,8 ± 0,19*	2,6±0,25
5' нуклеотидаза (нМоль/мг белка /мин)	22,3±4,5	–	36,8± 5,8*	–
Аденозин (мкМоль/г ткани)	0,31±0,014	0,2±0,02*	0,41±0,03*	0,34±0,03
Аденозиндеаминаза (нМоль/мг белка /мин)	22,6±2,4	–	33,6±3,5*	–
Мочевая кислота (мкМоль/г ткани)	0,26±0,015	0,22±0,015	0,38±0,06*	0,34±0,03

Примечание: \* - статистически значимая разница в отношении контроля ( $p<0,05$ );

Острая алкогольная нагрузка приводит к снижению концентрации аденозина во всех исследуемых отделах головного мозга контрольных крыс. В противоположность этому в мозге крыс, подвергшихся предварительной 7-дневной алкоголизации, через 60 минут после введения этанола уровень аденозина не изменялся.

Концентрация инозина и мочевой кислоты уменьшается, а уровень гуа

АМФ+АДФ увеличивается в коре больших полушарий мозга контрольных животных при острой алкоголизации. У крыс после семидневной нагрузки этанолом под действием острого введения алкоголя отмечается увеличение пула АМФ+АДФ и снижение инозина только в гипоталамусе. Содержание ксантина спустя час после введения этанола уменьшается в коре мозга контрольных животных, а также в гипоталамусе и продолговатом мозге обеих групп животных.

**Особенности метаболизма ацетил-КоА и биосинтеза ацетилхолина в головном мозге крыс со сформированной устойчивостью к наркотическому действию этанола.**

Нами обнаружено, что активность пируватдегидрогеназы в несинаптомальных митохондриях коры мозга крыс после семидневной алкоголизации на 75% выше по сравнению с аналогичным показателем интактных животных (табл. 4). Подобная тенденция отмечается и при измерении активности ПДК в изолированных нервных окончаниях коры мозга, однако разница в этом случае была не достоверна ( $p > 0,05$ ).

Таблица 4.

**Активность ферментов биосинтеза ацетил-КоА и ацетилхолина (нмоль/мин/мг белка) в субклеточных фракциях коры головного мозга крыс со сформированной устойчивостью к наркотическому действию этанола ( $M \pm S.E.M.$ ,  $n=5$ ).**

Фермент		Пируватдегидрогеназа	АцКоА-синтетаза	АТФ цитратлиаза	Холинацетилтрансфераза
Синапсомы	Контроль	6,52±1,2	0,86±0,2	1,61±0,21	3,53±0,19
	7дн.Эт.	8,2±2,1	2,08±0,26*	1,57±0,15	3,45±0,22
Митохондрии	Контроль	76,7±15,4	3,11±0,26	—	—
	7дн.Эт.	133,2±20,7*	2,81±0,32	—	—

Примечание: \* -статистически значимая разница в отношении контроля ( $p < 0,05$ ). Измерения проводили в дублированных пробах в пяти экспериментах.

Различная выраженность эффекта алкогольной нагрузки на активность пируватдегидрогеназы из несинаптомальных митохондрий и нервных окончаний, возможно, связана с кинетическими особенностями этого фермента [Battino M., et al., 1991]. Ввиду вышеизложенного мы выделили фермент из митохондрий клеток коры мозга и митохондрий нервных окончаний и сравнили их основные кинетические характеристики.

Константы Михаэлиса-Ментон для ПДК из митохондрий нервных окончаний и митохондрий тел клеток коры головного мозга равны соответственно 10,6 и 22,3 мкМ. Синтез субъединиц пируватдегидрогеназного комплекса (ПДК) митохондрий нервных окончаний происходит в теле нейрона, а сборка осуществляется непосредственно в синапсах [Deshmukh D.R., et al., 1980]. Высокое сродство к основному субстрату синапсоматального ПДК может быть связано с особенностями пространственного строения пируватдегидрогеназного комплекса митохондрий нервных окончаний.

Общеизвестно: одной из основных систем транспорта, образовавшегося в митохондриях ацетил-КоА, является цитратный шунт. Функционирование цитратного механизма связано с активностью АТФ-цитратлиазы. Функционально активный нейротрансмитерный пул ацетилхолина синтезируется в цитозоле при участии ацетилхолинтрансферазы. Эти два этапа оценивались нами по активности АТФ-цитратлиазы и ацетилхолинтрансферазы в нервных окончаниях коры головного мозга (табл 4). Установлено, что семидневная алкогольная нагрузка существенно не влияет на активность этих ферментов.

В результате проведенных экспериментов с моделированием синапсоматального метаболизма ацетилхолина *in vitro* обнаружено, что нервные окончания крыс со сформированной устойчивостью к наркотическому действию

Таблица 5.

**Характеристика основных этапов синтеза ацетилхолина нервными окончаниями коры головного мозга крыс со сформированной устойчивостью к наркотическому действию этанола (n=5, M ± S.E.M.).**

Параметр (единицы)	Контроль	7дн. Эт.
Утилизация пирувата (нмоль/мг белка/мин)	11,7 ± 1,4	13,6 ± 2,5
Образование цитрата (нмоль/ мин /мг белка)	1,44 ± 0,25	0,96 ± 0,14
Содержание ацетил-КоА (нмоль/мг белка)	30,7 ± 2,1	31 ± 1,4
Скорость синтеза ацетилхолина (нмоль/мин/мг белка)	15,98 ± 1,7	15,8 ± 0,3
+1 мМоль Са <sup>2+</sup>		
Утилизация пирувата (нмоль/мг белка/мин)	8,14 ± 1,0 <sup>+</sup>	9,88 ± 2,5 <sup>+</sup>
Образование цитрата (нмоль/ мин /мг белка)	0,25 ± 0,03 <sup>+</sup>	0,23 ± 0,04 <sup>+</sup>
Содержание ацетил-КоА (нмоль/мг белка)	38,4 ± 2,7	32,5 ± 5,3
Скорость синтеза ацетилхолина (нмоль/мин/мг белка)	21,18 ± 2,3 <sup>+</sup>	29,6 ± 1,1 <sup>+</sup> *
Квантовый выход ацетилхолина (нмоль/мин/ мг белка)	5,2 ± 0,9	13,8 ± 1,1 *

Примечание: <sup>+</sup> -статистически значимая разница в отношении аналогичной группы, без добавления в среду ионов Са<sup>2+</sup> (p < 0,05), \* -статистически значимая разница в отношении контроля (p < 0,05). Измерения проводили в дублированных пробах в пяти экспериментах.

этанол в стационарном состоянии не отличались от таковых животных контрольной группы по активности основных этапов биосинтеза ацетилхолина – скорости утилизации пирувата, синтезу цитрата, уровню ацетил-КоА и синтезу ацетилхолина (табл. 5).

Добавление в среду инкубации 1 мМоль  $\text{Ca}^{2+}$  приводило к ингибированию утилизации пирувата на 30%, а синтеза цитрата более чем на 70% синапсосомами животных обеих групп. Объяснением ингибирующего действия ионов кальция на уровень утилизации пирувата может служить торможение транспорта пирувата через мембрану синапсосомальных митохондрий. [Folders M., et al., 1977; Szutowicz A., et al., 1994].

Присутствие кальция в среде инкубации приводило к статистически значимому росту скорости высвобождения ацетилхолина из нервных окончаний обеих групп животных (табл. 5). Однако, квантовый выход этого медиатора у крыс со сформированной устойчивостью к наркотическому действию этанола был более чем в два раза выше по сравнению с контролем. Более активный кальций-стимулированный выход ацетилхолина из синапсосом крыс, устойчивых к наркотическому эффекту этилового алкоголя, вероятно, обусловлен вызванными этанолом изменениями кальциевых каналов [Lynch M., et al., 1983].

Активация ацетата нервными окончаниями коры головного мозга при формировании устойчивости к наркотическому эффекту этанола.

Таблица 6.

Характеристика основных этапов синтеза ацетилхолина нервными окончаниями коры головного мозга крыс со сформированной устойчивостью к наркотическому действию этанола в присутствии ацетата в условиях деполяризации (+ 1мМоль  $\text{Ca}^{2+}$ ) (n=5, M ± S.E.M.).

Параметр (единицы)/условия инкубации	Контроль	7дн.Эт.
Образование цитрата (нмоль/мин/мг белка)		
2,5 мМоль Пируват +2,5 мМоль Малат	0,25 ± 0,03	0,23 ± 0,04
2,5 мМоль Ацетат +2,5 мМоль Малат	0,19 ± 0,03	0,34 ± 0,07
Содержание ацетил-КоА (нмоль/мг белка)		
2,5 мМоль Пируват +2,5 мМоль Малат	38,4 ± 2,7	32,5 ± 5,3
2,5 мМоль Ацетат +2,5 мМоль Малат	11,4 ± 1,2	15,5 ± 0,7*
Скорость синтеза ацетилхолина (нмоль/мин/мг белка)		
2,5 мМоль Пируват +2,5 мМоль Малат	21,18 ± 2,3	29,6 ± 1,1 *
2,5 мМоль Ацетат +2,5 мМоль Малат	6,9 ± 0,8	11,86 ± 1,4*

Примечание: Синапсосомы коры головного мозга крыс инкубировали в деполяризующей ( $\text{Ca}^{2+}$ ) среде, содержащей 2,5 мМ ацетата и 2,5 мМ малата в отсутствие пирувата.

\* -статистически значимая разница в отношении контроля (p < 0,05). Измерения проводили в дублированных пробах в пяти экспериментах.

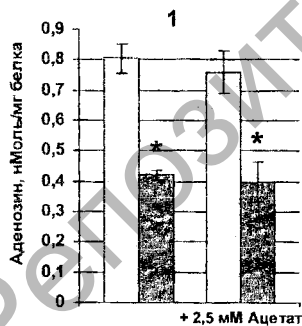


Нами выявлено, что после 30-минутной инкубации в среде, содержащей 2,5 ммоль ацетата, уровень ацетил-КоА и скорость синтеза ацетилхолина в синапсосомах крыс после семидневной алкоголизации были достоверно выше по сравнению с контролем на 35% и 70% соответственно (табл. 6).

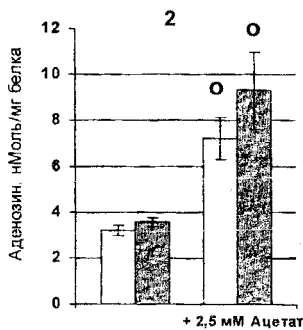
Одновременно нервные окончания коры головного мозга крыс после семидневной алкогольной нагрузки характеризовались значительно более высокой активностью ацетил-КоА синтетазы по сравнению с контрольными животными (табл. 4). Приведенные факты свидетельствуют об активации утилизации ацетата синапсосомами коры мозга крыс, устойчивых к наркотическому действию этанола.

Высвобождение аденозина из нервных окончаний коры головного мозга при формировании устойчивости к наркотическому действию этанола. Эффект ацетата.

Уровень аденозина в синапсосомах алкоголизованных животных был практически вдвое ниже по сравнению с аналогичным показателем у контрольной группы (рис. 1-1). Присутствие в инкубационной среде 2,5 мМ ацетата приводило более чем к 2-х кратному увеличению высвобождения аденозина из нервных окончаний коры головного мозга обеих групп животных (рис. 1-2). При этом синапсосомальный уровень этого нуклеозида существенно не изменялся.



□ контроль ■ 7дн.Эт.



□ контроль ■ 7дн.Эт.

**Рисунок 1.** Влияние ацетата на концентрацию аденозина (нМоль/мг белка) в нервных окончаниях (1) и инкубационной среде (2) коры головного мозга крыс со сформированной устойчивостью к наркотическому действию этанола. ( $n=5$ ,  $M \pm SEM$ ). Примечание: \* -статистически значимая разница в отношении контроля ( $p<0,05$ ); <sup>o</sup> -статистическая разница в отношении среды без добавления ацетата ( $p<0,05$ ). Измерения проводили в дублированных пробах в пяти экспериментах.

Данный эффект может объясняться, с одной стороны, ингибирующим действием ацетата на обратный захват аденозина в клетку [Fredholm B.B., et al., 1996], а с другой стороны, наработкой дополнительных количеств этого нуклеозида из АМФ, образующегося в результате активации ацетата [Israel Y., et al., 1994].

Влияние аденозина и хлораденозина на метаболизм ацетил-КоА и биосинтез ацетилхолина нервными окончаниями коры головного мозга крыс со сформированной устойчивостью к наркотическому эффекту этанола.

Аденозин в концентрации 10 мкМоль, а также хлораденозин в концентрации 1 мкМоль не влияли на скорость утилизации пирувата, синтез цитрата и уровень ацетил-КоА в нервных окончаниях коры головного мозга как алкоголизированных, так и контрольных животных. В то же время добавление в среду инкубации хлораденозина в концентрации 10 мкМоль приводило к потенцированию ингибирующего действия кальция на утилизацию пирувата в синапсосах интактных животных, не влияя на эти показатели у экспериментальных крыс. Эффект хлораденозина на утилизацию пирувата может реализовываться либо через систему транспорта пирувата, либо через модуляцию активности пируватдегидрогеназы посредством влияния на рецепторный аппарат.

Аденозин в концентрации 10 мкМоль и хлораденозин в концентрации 0,1 мкМоль существенно не влияли на  $Ca^{2+}$ -стимулированный выход ацетилхолина из синапсосом контрольных животных (табл. 7). Присутствие хлора-

**Таблица 7.**

**Влияние аденозина и хлораденозина на  $Ca^{2+}$ -стимулированный выход ацетилхолина (пМоль/мин/мг белка) из синапсосом коры головного мозга крыс со сформированной устойчивостью к наркотическому действию этанола.**

(n=5, M±S.E.M.).

Условия инкубации	Контроль	7дн.Эт.
(2,5 мМоль пируват + 2,5 мМоль Малат)	21,18 ± 4,6	29,6 ± 2,2 *
(2,5 мМоль пируват + 2,5 мМоль Малат) +10 мкМ Аденозин	18,5 ± 5,7	30,8 ± 3,8*
(2,5 мМоль пируват + 2,5 мМоль Малат) +0,1 мкМ Хлораденозин	18,1 ± 6,4	26,7 ± 4,2*
(2,5 мМоль пируват + 2,5 мМоль Малат) +1 мкМ Хлораденозин	16,5 ± 3,6	33,1 ± 6,8*
(2,5 мМоль пируват + 2,5 мМоль Малат) +10 мкМ Хлораденозин	14 ± 1,8 <sup>0</sup>	28,3 ± 5,2*

Примечание: \* - статистически значимая разница в отношении контроля ( $p < 0,05$ ), <sup>0</sup> - статистически значимая разница в отношении среды без хлораденозина и аденозина ( $p < 0,05$ ) Измерения проводили в дублированных пробах в пяти экспериментах.

аденозина в среде инкубации в концентрации 1 мкМоль нивелировало активирующее действие кальция на выброс ацетилхолина у контрольных животных. Кроме того, хлораденозин в концентрации 10 мкМоль приводил к статистически значимому угнетению холинергической активности кортикальных синапсов крыс без предварительного контакта с этанолом.

Нервные окончания животных, подвергнутых предварительной 7-дневной алкоголизации, оказались не чувствительны к эффектам аденозина и его агониста. Ни аденозин, ни хлораденозин существенно не влияли на  $\text{Ca}^{2+}$ -индуцированный выход ацетилхолина из кортикальных синапсов животных этой группы. Эти данные свидетельствуют в пользу снижения чувствительности  $A_1$ -рецепторов аденозина в процессе семидневной алкоголизации.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ.

1. Устойчивость к наркотическому действию этанола, которая развивается в процессе семидневной алкогольной нагрузки (3,5 г/кг, в/бр), сопровождается увеличением уровня ацетата в ткани мозга. Эти изменения имеют в мозге региональные особенности и касаются, преимущественно, коры больших полушарий [5, 7, 12].
2. Развитие устойчивости к наркотическому действию этанола сопровождается индукцией утилизации ацетата избирательно в коре больших полушарий головного мозга, что проявляется увеличением активности ацетил-КоА синтетазы в ткани мозга, повышением синапсоматального синтеза ацетил-КоА из ацетата [1, 4, 5, 7].
3. Формирование устойчивости к наркотическому действию этанола сопровождается увеличением эффективности использования ацетата в качестве предшественника для биосинтеза ацетилхолина и более активным  $\text{Ca}^{2+}$ -стимулированным выходом ацетилхолина из нервных окончаний коры головного мозга [3, 7, 8, 12].
4. Семидневная алкоголизация (3,5 г/кг, в/бр) приводит к активации катаболизма пуринов в коре больших полушарий головного мозга, проявляющейся ростом активности  $5'$ -нуклеотидазы и аденозиндеамины, а также увеличением пула АМФ+АДФ, концентрации аденозина и мочевой кислоты [7, 11, 12].
5. Устойчивость к наркотическому действию этанола, развивающаяся в процессе семидневной алкогольной нагрузки, связана с десенситизацией  $A_1$  пуринергических рецепторов, вызванной пролонгированным ацетат- и этанол-индуцированным увеличением уровня внеклеточного аденозина [7, 12].

**СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ.**Статьи

1. Оганесян Н.А. Активность пируватдегидрогеназы и ацетил-КоА синтетазы мозга крыс с различной чувствительностью к этанолу // Сборник материалов Гродненской областной конференции молодых ученых. Гродно, 2001. – С. 21-22.
2. Киселевский Ю.В., Оганесян Н.А., Оганесян А.А. Диагностические тесты при выявлении злоупотребления алкоголем // Медицинская панорама – 2001. – № 4. – С. 32-34.
3. Киселевский Ю. В., Оганесян Н. А., Шутович А. Метаболизм ацетилхолина в синапсоммах коры головного мозга крыс с индуцированной толерантностью к наркотическому действию этанола // Материалы 1-ой Российско-Белорусской конференции 19-20 июня 2002 г, Витебск, 2002. - С. 41-42.
4. Киселевский Ю. В., Оганесян Н. А., Лелевич В.В., Шутович А. Утилизация пирувата в митохондриях коры головного мозга крыс с индуцированной толерантностью к наркотическому действию этанола, эффект ацетата и аденозина // Материалы 1-ой Российско-Белорусской конференции 19-20 июня 2002 г, Витебск, 2002. - С. 42-43.
5. Киселевский Ю.В., Оганесян Н.А., Кулинич С. Г., Баранова Т.И., Зиматкин С. М., Пронько С. П., Паценко А. А., Томашевич М., Шутович А. Особенности активации ацетата в различных регионах головного мозга и изолированных нервных окончаниях при формировании алкогольной толерантности. // Актуальные вопросы современной медицины: Сборник научных трудов конференции, посвященной 200-летию узловой клинической больницы г. Гродно. Гродно, 2002. - С. 549-553.
6. Киселевский Ю.В. Оганесян Н.А. Аденозин и  $P_1$ -пуринергические рецепторы ЦНС // Журнал ГГМУ.–2003.–№ 1. С 9-12.
7. Kiselevski Y., Oganessian N., Zimatkin S., Szutowicz A., Angielski S., Niezabitowski P., Uracz W., Gryglewski R. Brain acetate metabolism in mechanisms of adaptation to ethanol // Med. Sci. Monit. – 2003. – Vol. 9. – N 5. – P. 178-182.

Тезисы

8. Kiselevski Y., Tomaszewicz M., Oganessian N., Jankowska A., Szutowicz A. Metabolism of two carbon units of acetylcholine in brain of long-sleep and short-sleep rats. II Konferencja neurochemiczna. Warszawa 1994. - P 10.
9. Tomaszewicz M., Jankowska A., Bielarczyk H., Kiselewski Yu., Oganessian N. Contribution of b-hydroxybutyrate to acetyl-CoA pools and acetylcholine synthesis in synaptosomes of adult rat brain. Ninth International symposium on cholinergic mechanisms. Mainz-Germany, June 7-10, 1995. - P. 2.

10. Kisiievski Yu. V., Oganesian N.A., Szutowicz A., Patcenko A.A., Baranova T.I., Grinevich T.N., Zimatkin S.M., Deitrich R.A. Activity of enzymes involved in acetyl-CoA synthesis in the brain of rats differing in sensitivity to hypnotic effect of ethanol // *Alcohol and alcoholism*. – 2001. – Vol. 36. – N. 5. – P. 484.
11. Kisiievski Yu. V., Bykov I.L., Oganesian N.A., Zimatkin S.M., Deitrich R.A. Purine metabolism in brain of rats differing in sensitivity to hypnotic effect of ethanol // *Alcohol and alcoholism*. – 2001. – Vol. 36. – N. 5. – P. 484.
12. Киселевский Ю. В., Оганесян Н.А., Зиматкин С.М. Холинергические и пуринергические механизмы адаптации к действию этанола. // *Медицинская панорама*. – 2002. – Т. 20. - № 5. – С. 35.

## РЭЗЮМЭ

Аганесян Мікалай Андранікавіч

Пурынэргічныя і халінэргічныя механізмы ўстойлівасці да наркатычнага ўздзеяння этанолу.

Ключавыя словы: устойлівасць, наркатычнае ўздзеянне, этанол, мозг, ацэтат, ацэтыл-КоА, ацэтылхалін, адэназін, пурынэргічныя рэцэптары.

Аб'ект і прадмет даследвання: узровень ацэтату, ацэтыл-КоА, адэназіна ў мозгу, актыўнасць піруватдэгідрагеназы, ацэтыл-КоА сынтэтазы, адэназін-дэаміназы, 5'-нуклеатыдазы ў мозгу. Хуткасць утылізацыі піруваты, сынтэза цытрату, узровень ацэтыл-КоА, адэназіну і ацэтылхаліну ў сінатасомах.

Мэта працы: з'ясненне ролі адэназіна ў мадуляцыі халінэргічнай актыўнасці цэнтральнай нервовай сістэмы пры фарміраванні ўстойлівасці да наркатычнага ўздзеяння этанолу.

Метады даследвання: газавая і высокаэфектыўная вадкасная храматаграфія, люмінаметрычны, радыёметрычны і спектрафотаметрычны аналізы.

Атрыманыя вынікі і іх навізна: Упершыню паказана, што вострае, таксама як і 7-дзённае алкагольнае ўздзеянне (3,5 г/кг, у/бр) вядзе да ўзросту ўзроўня ацэтату ў кары мозгу. Акрамя таго, упершыню прадэманстравана, што развіццё ўстойлівасці да наркатычнага ўздзеяння этанолу саправаджаецца актывацыяй метабізму пурынаў выключна ў кары мозгу. Гэта праяўляецца павялічэннем узроўня АМФ+АДФ, адэназіна і мачавой кіслаты, таксама як і актыўнасці 5'-нуклеатыдазы і адэназындэаміназы. Семідзённая алкагалізацыя (3,5 г/кг, у/бр) саправаджаецца індукцыяй утылізацыі ацэтату выключна ў кары вялікіх палушарый галаўнога мозгу, што праяўляецца ўзростам актыўнасці ацэтыл-КоА сынтэтазы у ткані мозгу і павялічэннем сінатасамальнага сінтэза ацэтыл-КоА і ацэтылхаліна з ацэтату. Зніжэнне працягласці пасляалкагольнага наркозу, саправаджаецца актывацыяй  $\text{Ca}^{2+}$ -стымуляванага выхаду ацэтылхаліна з сінатасомаў кары галаўнога мозгу. Упершыню паказана, што ўстойлівасць да наркатычнага ўздзеяння этанолу звязана з паніжэннем адчувальнасці  $\text{A}_1$ -пурынэргічных рэцэптараў, пабуджаным доўгатэрміновым ацэтат- і этанол-індукаваным павялічэннем узроўня пазаклетачнага адэназіна.

Рэкамендацыі па выкарыстанню: атрыманыя вынікі дэманструюць роль нейрамадуляторнага дзеяння адэназіну на халінэргічную нейратрансмісію ў механізмах устойлівасці да наркатычнага эфекту этанолу. Акрамя таго, атрыманыя вынікі паслужаць асновай да распрацоўкі паспяховай фармакалагічнай карэкцыі залежнасці ад алкаголю.

Галіна выкарыстання: наркалогія, фармакалогія, нейрахімія.

Оганесян Николай Андраникович

Пуринергические и холинергические механизмы устойчивости к наркотическому действию этанола.

Ключевые слова: устойчивость, наркотическое действие, этанол, мозг, ацетат, ацетил-КоА, ацетилхолин, аденозин, пуринергические рецепторы.

Объект и предмет исследования: уровень ацетата, ацетил-КоА, аденозина в мозге, активность пируватдегидрогеназы, ацетил-КоА синтетазы, аденозиндеаминазы, 5'-нуклеотидазы в мозге. Скорость утилизации пирувата, синтеза цитрата, уровень ацетил-КоА, аденозина и ацетилхолина в синапсосомах.

Цель работы: выяснение роли аденозина в модуляции холинергической активности центральной нервной системы при формировании устойчивости к наркотическому действию этанола.

Методы исследования: газовая и высокоэффективная жидкостная хроматография, люминометрический, радиометрический и спектрофотометрический анализ.

Полученные результаты и их новизна: Впервые показано, что как острая, так и 7-дневная алкогольная нагрузка (3,5 г/кг; в/бр) приводит к увеличению уровня ацетата, преимущественно в коре мозга. Кроме того, впервые показано, что развитие устойчивости к наркотическому действию этанола сопровождается активацией метаболизма пуринов изолированно в коре мозга. Это проявляется увеличением уровня АМФ+АДФ, аденозина и мочевой кислоты, а также активности 5'-нуклеотидазы и аденозиндеаминазы. Семидневная алкоголизация (3,5 г/кг; в/бр) сопровождается индукцией утилизации ацетата избирательно в коре больших полушарий головного мозга, что проявляется увеличением активности ацетил-КоА синтетазы в ткани мозга и повышением синапсосомального синтеза ацетил-КоА и ацетилхолина из ацетата. Снижение продолжительности посталкогольного наркоза сопровождается более активным  $\text{Ca}^{2+}$ -стимулированным выходом ацетилхолина из нервных окончаний коры головного мозга. Нами впервые показано, что формирование устойчивости к наркотическому эффекту этанола связано с десенситизацией  $\text{A}_1$ -пуринергических рецепторов, вызванной пролонгированным ацетат- и этанол-индуцированным увеличением уровня экстраклеточного аденозина.

Рекомендации по использованию: полученные результаты позволяют оценить роль нейромодуляторного влияния аденозина на холинергическую нейротрансмиссию в механизмах устойчивости к наркотическому действию этанола. Кроме того, предполагается, что полученные результаты послужат основой для разработки успешной фармакологической стратегии лечения алкоголизма.

Область применения: наркология, фармакология, нейробиология.

## SUMMARY

Oganesian Nicolay Andranikovich

Purinergic and cholinergic mechanisms of the resistance to the narcotic effect of ethanol.

Key words: resistance, narcotic effect, ethanol, brain, acetate, acetyl-CoA, acetylcholine, adenosine, purinergic receptors.

Object of the study: levels of acetate, acetyl-CoA and adenosine as well as activities of the piruvatedehydrogenase, acetyl-CoA synthetase, adenosindeaminase, 5'-nucleotidase in the brain. The utilization of piruvate and citrate synthesis and levels of acetyl-CoA, adenosine and acetylcholine in synaptosomes.

Aim of the study: Clarification of the role of adenosine in modulation of the cholinergic activity of the central nervous system when forming resistance to narcotic effect of ethanol.

Methods of the research: GS, HPLC, lumminometry, spectrophotometry, radiometric assay.

Obtained results and their newness: For the first time it was showed, that both acute and 7-days alcoholic loading (3,5 g/kg, i.p.) leads to the increasing of acetate level, mainly in the cortex. Besides, for the first time it was showed, that the developing of the resistance to narcotic effect of ethanol is accompanied by the increase of the purins metabolism only in the cortex. It reveals itself in the increasing of the levels of AMP+ADP, adenosine, urine acid and in the increasing of the 5'-nucleotidase and adenosindeaminase activities. 7-days treatment with ethanol (3,5 g/kg, i.p.) is accompanied by the acceleration of the acetate utilization in the cortex, which reveals in increasing of the acetyl-CoA synthetase activity as well as synaptosomal synthesis of acetyl-CoA and acetylcholine from acetate. Reduction of the duration of the post-alcoholic sleeping time is accompanied by the more active  $Ca^{2+}$  stimulated acetylcholine release from synaptosomes. We were the first who showed, that the formation of the resistance to narcotic effect of ethanol is connected with the  $A_1$ -type of purinergic receptors desensitization, caused by the acetate-induced prolonged high extracellular adenosine level.

Application recommendations: the obtained results allow to estimate the role of the adenosine in the neuromodulatory effect on cholinergic neurotransmissions in the mechanisms of the resistance to narcotic effects of ethanol. Besides it is assumed that the obtained results will become the basis for the development of the future successful treatment of the alcoholism.

Application area: neurochemistry, pharmacology, narcology.