

УДК 577.158.344:591.11:577.113.3

ВКЛАД КАТАЛАЗЫ В ПРИЖИЗНЕННЫЙ МЕТАБОЛИЗМ ЭТАНОЛА В МОЗГЕ КРЫС

А.Л. Бубен, мл. научный сотр.; С. М. Зиматкин д.б.н., профессор

Лаборатория аналитической биохимии ЦНИЛ

УО «Гродненский государственный медицинский университет»

Разработанный метод прижизненного исследования метаболизма этанола в вентрикуло-цистернальном перфузате мозга крыс использован для изучения влияния ингибиторов каталазы на уровень метаболизма этанола в головном мозге крысы. Животных под наркозом помещают в стереотаксический аппарат, через отверстие в черепе в боковой желудочек мозга вводят искусственную цереброспинальную жидкость с этанолом и ингибиторами каталазы. Определение проводят методом газовой хроматографии с пламенно-ионизационным детектированием. Результаты подтверждают высокую роль каталазы головного мозга в процессах окисления этанола.

Ключевые слова: этанол, ацетальдегид, ингибитор каталазы, аминотриазол, азид натрия.

The developed method of vital investigation of ethanol metabolism in the ventriculo-cisternal perfusate of rat brain was used for the study of the influence of catalase inhibitors on the ethanol metabolism level in rat brain. Anesthetized rats were placed in a stereotaxic apparatus and perfused with artificial cerebro-spinal liquid with ethanol & catalase inhibitors solution through the ventriculo-cisternal system of the brain. The samples were analysed by the GC with the flame ionization detection. The results of the given study confirm an important role of brain catalase in the processes of ethanol oxidation in brain tissue.

Key words: ethanol, acetaldehyde, catalase inhibitor, aminotriazole, sodium azide.

Введение

Исследования алкоголизма занимают особое место в современной биохимии. До недавних пор основным действующим агентом в процессе алкогольной интоксикации считался непосредственно этанол. Ранние исследования показывали отсутствие ферментных систем (алкогольдегидрогеназа I типа) в головном мозге и, таким образом, отрицали возможность окисления этанола непосредственно мозгом. Проникновению в ткань мозга из крови самого активного метаболита этанола – ацетальдегида (АА) препятствует альдегиддегидрогеназа, находящаяся в гематоэнцефалическом барьере. [1, 10, 9]

АА способен проникать в головной мозг через ГЭБ только в концентрациях, которые не могут появиться в обычных условиях при окислении алкоголя. Концентрации АА могут достигать таких величин (150 – 200 мкМ) только при условии применения ингибиторов альдегиддегидрогеназы. [8] Таким образом, проникновение АА в головной мозг с периферии при потреблении алкоголя исключается. В то же время известно, что АА способен вызывать ряд специфических реакций головного мозга, которые характерны для алкогольного опьянения. Относительно недавние исследования показали, что этанол способна окислять особая форма цитохрома P450 – 2E1 и каталаза мозга в присутствии гидроперекиси [6, 5, 11]. Таким образом, было показано, что этанол способен окисляться в гомогенатах головного мозга с образованием АА. Наши предварительные эксперименты показали возможность окисления этанола и образование АА в живом мозге крысы [2]. В настоящем исследовании мы изучали влияние ингибиторов каталазы

– аминотриазола и азид натрия на прижизненный метаболизм этанола в головном мозге крыс.

Материалы и методы

Перфузионный раствор вводили стереотаксически через иглу в боковой желудочек головного мозга. Пробы перфузата отбирали из большой цистерны мозга. Координаты по атласу головного мозга крысы Paxinos & Watson: – 0,9 мм дистальнее брегмы в лобно-затылочном направлении, 1,5 мм латеральнее срединной линии черепа. Глубина введения – 3,5 мм. Отбор ликвора осуществлялся каждые 5 или 10 минут через иглу, введенную в большую цистерну мозга (БЦМ) путём прокола твёрдой мозговой оболочки в точке, равноудалённой от боковых стенок БЦМ, располагающейся на глубине 1,5 мм от проецируемой на коже точки, на 1,5 мм проксимальнее места наибольшей подвижности твёрдой мозговой оболочки, определяемым при надавливании пуговчатым зондом. Игла соединялась тefлоновым капилляром со шприцем, установленным в микронасосе с постоянной скоростью протока 12 мкл/мин. Выход перфузата из большой цистерны мозга осуществлялся самотёком под влиянием повышенного давления нагнетаемой жидкости.

Для перфузии использовали 100 мМ раствор этанола в искусственной цереброспинальной жидкости (ИЦСЖ: NaCl – 120 мМ; KCl – 3,5 мМ; CaCl₂ – 1,5 мМ; MgCl₂ – 1,3 мМ; NaHCO₃ – 1,2 мМ; NaH₂PO₄ – 1,2 мМ), в которой был растворён аминотриазол в концентрации 10 мМ. В другом эксперименте в ИЦСЖ с этанолом растворяли азид натрия в концентрациях 20 и 10 мМ. Первые полчаса через мозг крысы перфузировали ИЦСЖ с этанолом без ингибитора для выяснения базового уровня

ня метаболизма алкоголя. Общая длительность перфузии составляла 5 часов в случае аминотриазола и 3 часа в случае азидата натрия.

Ацетальдегид определяли на газовом хроматографе HP 6890 с ПИД и колонкой размером 2,5 м. х 2 мм; наполненной хроматоном N-AW DMCS, пропитанным Carbowax 5% 20M; инжектор 170 °C, печь 70 °C, детектор 220 °C. Для исключения артефактного АА производилась калибровка его образования в пробах с различными концентрациями этанола. Найденный уровень артефактного АА в дальнейшем вычитался из полученных данных.

Полученные данные обрабатывали методами непараметрической статистики с помощью программы "Statistica 6.0".

Результаты исследования и их обсуждение

Полученные результаты показали, что под действием аминотриазола уровень этанола в перфузате достоверно возрос с 12 до 40 мМ.

Установлена достоверная зависимость между временем воздействия аминотриазола и снижением окисления этанола ($p = 0,039$) в живом мозге крысы. (рис. 1) При этом достоверного снижения уровня ацетальдегида не было выявлено. Его уровень оставался на уровне 25-30 мкМ в течение всего эксперимента, что можно объяснить побочным действием аминотриазола на АЛДГ мозга. Это приводит к подавлению окисления АА, образуемого в меньших количествах угнетённой каталазой мозга.

Под действием другого ингибитора каталазы азидата натрия на метаболизм этанола в головном мозге животных показана высокодостоверная ($p < 0,01$) зависимость между временем воздействия ингибитора на головной мозг и уровнем этанола и ацетальдегида. Также выявлено высокодостоверное влияние фактора уровня этанола на уровень ацетальдегида во временной шкале эксперимента. Через 30 минут после начала воздействия препарата уровень ацетальдегида достоверно упал ($p = 0,008$). Подобная тенденция сохранилась до окончания эксперимента. В свою очередь, метаболизм этанола в головном мозге крысы начал расти сразу после начала воздействия препарата (рис. 2).

В эксперименте с воздействием азидата натрия в концентрации 10 мМ выяснилось, что уровень этанола достоверно поднялся до уровня 25 мМ через полчаса после начала воздействия препарата ($p = 0,000035$) (рис. 3). Подобная тенденция сохранилась до конца эксперимента. Уровень ацетальдегида не претерпел значительных изменений в шкале времени, сохранившись на уровне 35 – 40 мкМ.

Таким образом, более высокое содержание ингибитора каталазы реализуется в падении уровня ацетальдегида. Во всех случаях воздействия ингибитора каталазы выявлено высокодостоверное влияние фактора времени на уровни неметаболизированного этанола. Уровень ацетальдегида практически не изменялся, достоверно снижаясь в опы-

те с азидом натрия в концентрации 20 мМ, через полчаса после начала действия ингибитора.

Заключение

Полученные данные подтверждают значительный вклад каталазы в метаболизм этанола в живом мозге крысы. Это соответствует литературным данным о ведущей роли каталазы в окислении этанола в гомогенатах мозга крысы (в опытах *in vitro*). На уровне ацетальдегида ингибиторы практически не оказали воздействия, за исключением высокой концентрации азидата натрия (20 мМ), что объясняется более глубокими необратимыми нарушениями метаболизма этанола, затрагивающими и систему цитохромов. Следует учитывать и большую разницу в количествах АА и метаболизированного этанола, играющую большую роль в процессах окисления этанола и образования ацетальдегида.

Литература

1. Зиматкин С.М., Островский Ю.М. Активность альдегиддегидрогеназы в барьерных структурах мозга // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 1988. – №9. – С. 283–284.
2. Зиматкин С.М., Бубен А.Л. Метод исследования окисления этанола в живом мозге // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2006. – №9. – С. 357 – 360.
3. Amit Z., Smith BR. The role of acetaldehyde in alcohol addiction // in: Crow KE, Batt RD (Eds) Human Metabolism of Alcohol. Boca Raton, FL, CRC Press. – 1989. – Vol. 2. – P. 193-200.
4. Amit Z., Aragon C.M.G. Catalase activity measured in rats naive to ethanol correlates with later voluntary ethanol consumption: possible evidence for a biological market system of ethanol intake // Psychopharmacology. – 1988. – Vol. 95. – P. 512–515.
5. Aragon C.M.G., Rogan F., Amit Z. Dose- and time-dependent effect of an acute 3-amino-1,2,4-triazole injection on rat brain catalase activity // Biochemical Pharmacology. – 1991. – Vol. 42. – P. 699–702.
6. Aragon C.M.G., Amit Z. The effect of 3-amino-1,2,4-triazole on voluntary ethanol consumption: evidence for brain catalase involvement in the mechanism of action // Neuropharmacology. – 1992. – Vol. 31. – P. 709–712.
7. Aragon C.M.G., Rogan F., Amit Z. Ethanol metabolism in rat brain homogenates by catalase H₂O₂ system // Biochemical Pharmacology. – 1992. – Vol. 44. – P. 93–98.
8. Tabakoff B., Von Wartburg J.P. Separation of aldehyde reductases and alcohol dehydrogenase from brain by affinity chromatography: metabolism of succinic semialdehyde and ethanol // Biochem. Biophys. Res. Commun. – 1975. – Vol. 63. – P. 957–66.
9. Weiner H., Ardel B. Distribution and properties of aldehyde dehydrogenase in regions of rat brain // Journal of Neurochemistry. – 1984. – Vol. 42. – P. 109–115.
10. Зиматкин С.М. Гистохимическое исследование альдегиддегидрогеназы в мозге крысы // Журнал неврохимии – 1991. – Vol. 56. – P. 1–11.
11. Зиматкин С.М., Лиопо А.В., Деитрих Р.А. Распределение и кинетика этанолного метаболизма в мозге крысы // Алкоголизм: Клиника и Экспериментальное Исследование. – 1998. – Vol. 22. – P. 1623–1627.

Resume

CATALASE CONTRIBUTION TO THE VITAL ETHANOL METABOLISM IN RAT BRAIN

A. L. Buben, S. M. Zimatkin

Grodno State Medical University

This paper describes the materials of scientific investigation of the influence of catalase inhibitors on the ethanol metabolism in the rat brain. The results obtained during the experiments with brain tissue homogenates confirm an important role of catalase in the ethanol metabolism in the rat brain.

Поступила 31.01.07

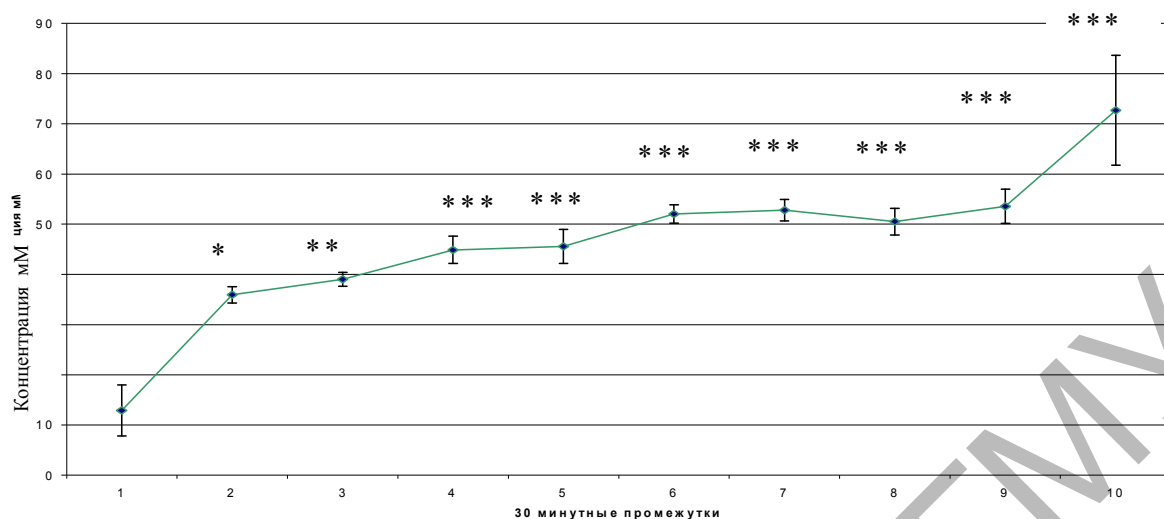


Рис.1 Концентрация этанола в перфузате головного мозга крысы под воздействием аминотриазола.
 $*-p<0,05$; $**p<0,01$; $***p<0,001$ по сравнению с контрольным периодом (1)

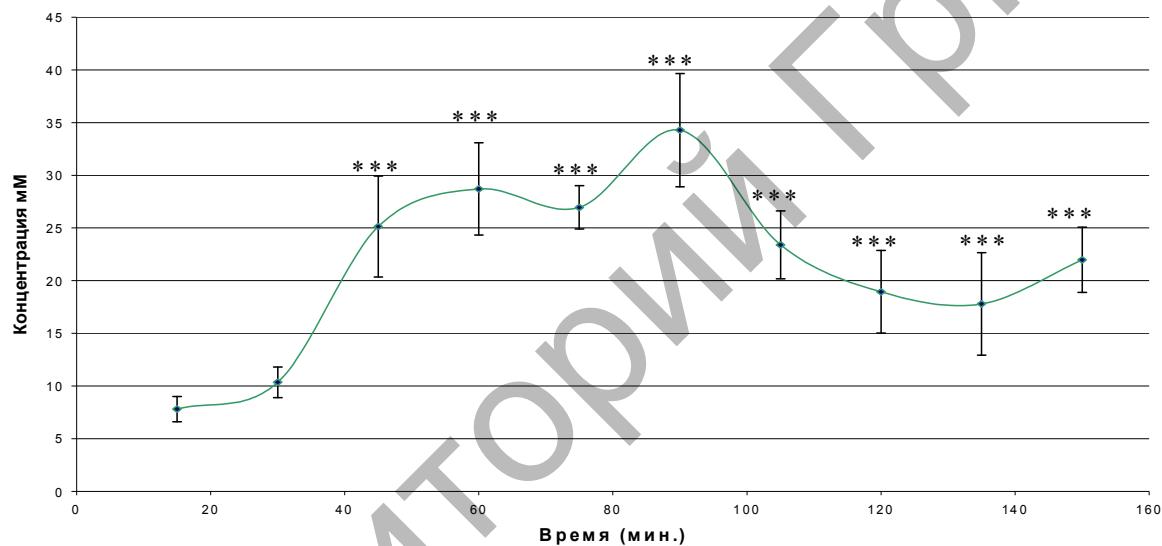


Рис.2 Концентрация этанола в перфузате головного мозга крысы под воздействием азидата натрия 20 мМ.
 Два первых 15-минутных промежутков – контрольное воздействие раствором этанола в ИЦСЖ без ингибитора.
 $*-p<0,05$; $**p<0,01$; $***p<0,001$ по сравнению с контрольным периодом (1-2)

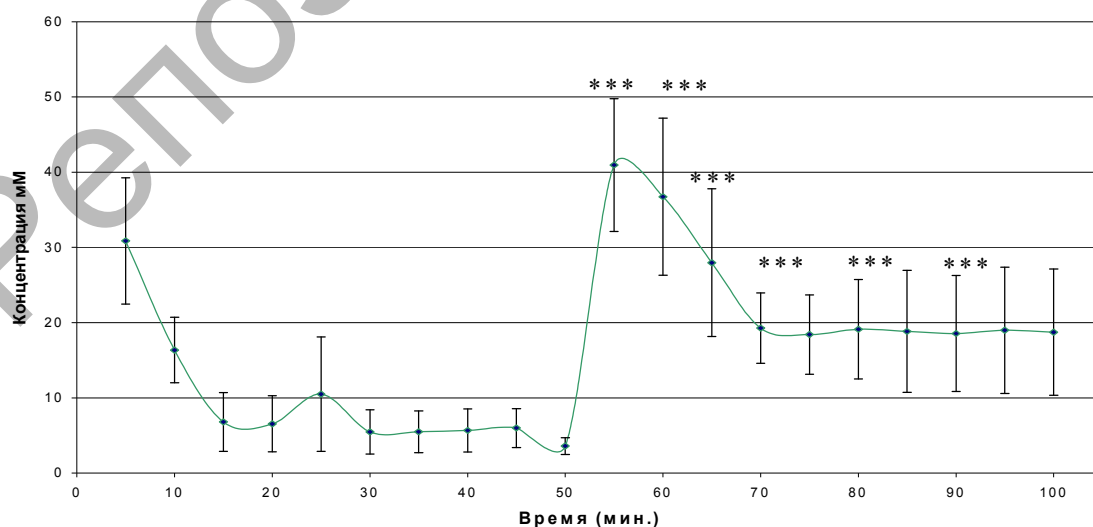


Рис.3 Концентрация этанола в перфузате головного мозга крысы под воздействием азидата натрия 10 мМ.
 Первые 30 минут – контрольное воздействие раствором этанола в ИЦСЖ без ингибитора.
 $*-p<0,05$; $**p<0,01$; $***p<0,001$ по сравнению с контрольным периодом