

СОДЕРЖАНИЕ АЦЕТАЛЬДЕГИДА В КРОВИ И МОЗГЕ МЫШЕЙ ПОСЛЕ ЕГО ПЕРИФЕРИЧЕСКОГО ВВЕДЕНИЯ В БОЛЬШИХ ДОЗАХ

С.М. Зиматкин, д.б.н. профессор; А.Л. Бубен, аспирант;
А.В. Наумов к.м.н.; С.П. Пронько; В.Ю. Смирнов к.б.н.

Кафедра гистологии, ЦНИЛ

УО «Гродненский государственный медицинский университет»

Ацетальдегид (АА) является важным метаболитом этанола, опосредующим его действие на мозг. Недавно обнаружены поведенческие эффекты АА, введённого периферически в больших дозах (100–300 мг/кг). Представляло интерес выяснить при этом его концентрации в организме животных. Установлено, что у беспородных и линейных мышей содержание АА в крови и мозгу дозозависимо возрастало (от 0,2 до 3 мМ) уже через 5 минут после введения, а через 15 минут снижалось. Это свидетельствует о быстром метаболизме АА в организме мышей и недостаточности ГЭБ для АА при высоких его концентрациях. Таким образом, при периферическом введении АА вызывает поведенческие эффекты лишь в концентрациях, в сотни раз превышающих те, которые могут образоваться в организме при метаболизме этанола. Это указывает на принципиальные отличия психотропного действия периферического и центрального ацетальдегида.

Ключевые слова: Ацетальдегид, метаболизм ацетальдегида, поведенческие эффекты, мыши.

Acetaldehyde is the important metabolite of ethanol mediating its effect on the brain. The behavioral effects of AA injected peripherally in high doses (100–300 mg/kg) have been revealed recently. We aimed to determine its concentrations in the organism of animals. It has been estimated that in outbred and linear mice the content of AA in the blood and brain increased depending on the dose (from 0,2 up to 3 mm) in 5 minutes after injection and it decreased in 15 minutes. It is the evidence of the rapid metabolism of AA in the organism of mice and it also indicates the deficiency of BBB for AA in its high concentrations. Thus, the peripheral injection of AA produces behavioral effects only in concentrations hundreds times exceeding those ones that can be produced in the organism in the metabolism of ethanol. It indicates the principal differences of psychotropic action of peripheral and central acetaldehyde.

Key words: Acetaldehyde, metabolism of acetaldehyde, behavioral effects.

Введение

Ацетальдегид (АА) является важным метаболитом этанола, в значительной степени опосредующим его действие на мозг, включая нейрохимические, поведенческие и нейротоксические эффекты. Однако это действие может оказывать АА, образующийся из этанола непосредственно в мозге либо введённый в него, минуя гематоэнцефалический барьер (ГЭБ) [2, 5, 7, 8, 9]. Недавно обнаружены поведенческие эффекты (седативный, гипнотический и амнестический) АА, введённого периферически в больших дозах [3]. Представляло интерес выяснить при этом его концентрации в крови и способность проникать в мозг животных в сроки и дозах, вызывающих эти поведенческие эффекты.

Материалы и методы

Исследование проведено на 38 половозрелых беспородных белых мышах самцах массой 20–35 г. и на 44 половозрелых мышах самцах линии C57/BL массой 20–30 г. Животных содержали в обычных условиях вивария, воду и корм не ограничивали. С 9:00 до 11:00 им вводили внутривенно

но 0,5; 1,7; 3 % растворы ацетальдегида в физ. растворе в дозах: беспородным мышам – 50, 170, 300 мг/кг; мышам линии C57/BL – 100, 170, 300 мг/кг. Контрольным мышам на эти же сроки вводили эквивалентные количества физ. раствора. Через 5 и 15 мин. мышей декапитировали, брали образцы крови и мозга, которые до анализа хранили в жидком азоте. Соблюдались все правила гуманного обращения с животными.

В работе использовали высококачественные реактивы: ацетальдегид 99,5 % чистоты (для хроматографии) фирмы Fluka, ацетонитрил GC фирмы Merck, метанол GC фирмы Merck, десфериоксамин фирмы Sigma, хлорную кислоту фирмы «Рехим».

Определение содержания ацетальдегида

К образцам крови добавляли ледяную 0,6 М HClO_4 1:4 или готовили гомогенат мозга 1:4 на ледяной 0,6 М HClO_4 , содержащей внутренний стандарт (пропанол). 0,4 мл. пробы вносили в плотно закрытые флаконы и инкубировали в течение 15 минут на водяной бане при температуре 65°C. Затем 1 мл парогазовой фазы вводили в газовый хро-

матограф HP 6890 с ПИД и колонкой размером 2,5 м x 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.

Определение содержания ацетата

0,3 мл крови или гомогената мозга добавляли во флакон, содержащий 0,1 мл метанола, 0,1 мл серной кислоты и 0,1 мл 0,1% ацетонитрила, используемого в качестве внутреннего стандарта. Пробы инкубировали 25 минут на водяной бане при температуре 65°C. Затем 1 мл парогазовой фазы вводили в газовый хроматограф HP 6890 с ПИД и колонкой размером 2,5 м x 2 мм; наполненной хроматоном N-AW DMCS, пропитанным Carbowax 5% 20M; инжектор 170°C, печь 70°C, детектор 220°C.

Полученные цифровые данные обрабатывали статистически с использованием программных пакетов Anova и Manova программы Statistica for Windows, 6.0.

Результаты и обсуждение

Через 5 мин. после внутрибрюшинного введения АА в дозах 50 – 300 мг/кг в крови и мозге беспородных и линейных мышей обнаружены очень высокие концентрации АА, которые дозозависимо возрастали (табл. 1, 2). Это свидетельствует о быстром всасывании его в кровь и распределении по тканям организма. Однако уже через 15 минут после введения уровень АА снижается (табл. 1, 2). Это свидетельствует о его быстром метаболизме в организме мышей, вероятно, с помощью альдегиддегидрогеназы (АльДГ). Во всех группах уровень АА в мозге был ниже, чем в крови. Это, по – видимому, обусловлено наличием гематоэнцефалического барьера (ГЭБ) для альдегидов, представленного АльДГ эндотелия кровеносных капилляров и окружающих астроцитов [1]. При низких концентрациях в крови АА полностью окисляется АльДГ ГЭБ и не проникает в нервную ткань [4, 6], а при таких высоких его уровнях в крови, как в настоящей работе, АА не успевает полностью метаболизироваться и в возрастающих концентрациях проникает в мозг. Это согласуется с ранее полученными данными о том, что периферический ацетальдегид начинает свободно проходить через ГЭБ, если его концентрация в кро-

ви превышает 100-250 мкМ [4, 6]. Ацетальдегид-метаболизирующую способность ГЭБ в нашем эксперименте можно приблизительно рассчитать, как разницу между уровнями АА в крови и мозге. Она заметно уменьшается через 15 минут после введения АА, вероятно, из-за угнетения фермента (табл. 1, 2). Установлена высокая положительная корреляция между уровнями АА в крови и мозге как у беспородных ($r=0,998$; $p<0,0001$), так и у линейных ($r=0,98$; $p<0,0001$) мышей.

Статистический анализ полученных данных выявил достоверное влияние дозы ацетальдегида [$F=338,71$; $p<0,0$], времени после введения [$F=36,45$; $p<0,0$] и «объекта исследования» (кровь или мозг) [$F=7,94$; $p<0,0062$]. Кроме того, отмечено достоверное взаимодействие факторов «доза» - «объект исследования» [$F=12,16$; $p<0,000002$] и факторов «время после введения» - «доза введения ацетальдегида» [$F=4,21$; $p<0,00845$]. У беспородных белых мышей было отмечено достоверное влияние дозы АА [$F=82,94$; $p<0,0$] и отмечено достоверное взаимодействие факторов «доза» - «время» [$F=6,58$; $p<0,00065$].

Интересно, что периферически введенный АА только в высоких концентрациях, в сотни раз превышающих его концентрации, обычно образующиеся в процессе метаболизма этанола, вызывает поведенческие эффекты [3]. Причиной этого может являться то, что образующийся в мозге из этанола ацетальдегид может накапливаться специфически в мозговых аминергических нейронах, которые обладают высокой активностью этанолметаболизирующего фермента каталазы, но низкой активностью альдегидокисляющего фермента АльДГ [10]. В настоящем исследовании АА, проходящий через ГЭБ, по-видимому, распределяется

Таблица 1. Концентрация ацетальдегида в крови и мозге беспородных белых мышей (мкМ)

Время после введения	5 минут			15 минут		
Доза введения АА (мг/кг)	50	170	300	50	170	300
Кровь	220±33,9* ⁺	950±75,1* ⁺	2940±560,6	76±16,2	490±122	1470±60,4 ⁺
Мозг	160±19,3 *	660±44,9*	2550±442,4	69±13,5	410±118,1	1280±54,4

* - $P<0,05$ при сравнении с 15 минутами

⁺ - $P<0,05$ при сравнении с мозгом

Таблица 2. Концентрация ацетальдегида в крови и мозге мышей линии C57/BL (мкМ)

Время после введения	5 минут			15 минут		
Доза введения АА (мг/кг)	50	170	300	50	170	300
Кровь	710±140 ⁺	1400±199* ⁺	3550±95* ⁺⁺⁺	470±81,3	640±66 ⁺⁺⁺	2800±168 ⁺⁺⁺
Мозг	530±100	1040±100 [*]	2500±110 [*]	400±63	460±62	1930±137

* - $P<0,05$ при сравнении с 15 минутами

⁺ - $P<0,05$ при сравнении с мозгом

равномерно между разными структурами мозга, которые могут различаться по чувствительности и функциональному ответу на АА. Следовательно, результирующие поведенческие эффекты АА, пришедшего из крови и появляющегося локально внутри структур головного мозга вслед за введением этанола, могут различаться. Кроме того, возможны не прямые эффекты ацетальдегида, циркулирующего в крови, на функции мозга и поведение, например, через эндокринную и вегетативную (симпатическую) нервную систему.

В крови и мозге контрольных мышей C57/BL обнаружены значительные уровни эндогенного ацетата. Его концентрация в мозге была значительно выше, чем в крови (рис.). После введения АА в крови и мозге появляется значительное дополнительное количество ацетата, образующегося при окислении АА. Содержание ацетата через 5 минут как в крови, так и в мозге дозозависимо возрастает (Рис.). Отмечено достоверное влияние дозы вводимого АА на концентрацию ацетата [$F=28,57$; $p<0,0$]. Кроме того, отмечено достоверное взаимодействие факторов «доза» - «объект исследования» [$F=9,35$; $p<0,00003$] То есть дозозависимое нарастание ацетата в крови было больше, чем в мозге. Через 15 минут эта линейность нарушается, поскольку после дозы 100 и 170 мг/кг уровень ацетата в крови снижается до эндогенных значений, а после 300 мг/кг – остаётся значительно повышенным в крови (рис.). Возможно, образующийся в больших количествах при окислении этой дозы АА ацетат не успевает достаточно полно метаболизироваться в организме. Отмечена высокая корреляция между уровнями ацетата в мозге и крови ($r=0,816$; $p<0,05$), а также между АА и ацетатом в крови ($r=0,96$; $p<0,001$) и мозге ($r=0,921$; $p<0,001$).

Выводы

Введённый внутрибрюшинно беспородным и C57/BL мышам в больших дозах (50 – 300мг/кг) ацетальдегид быстро всасывается в кровь и проникает в мозг и дозозависимо уже через 5 минут достигает там очень высоких уровней, а затем быстро метаболизируется и его уровень снижается уже через 15 минут после введения. При этом в тканях мышей наблюдается кратковременный дозозависимый прирост первого метаболита АА аце-

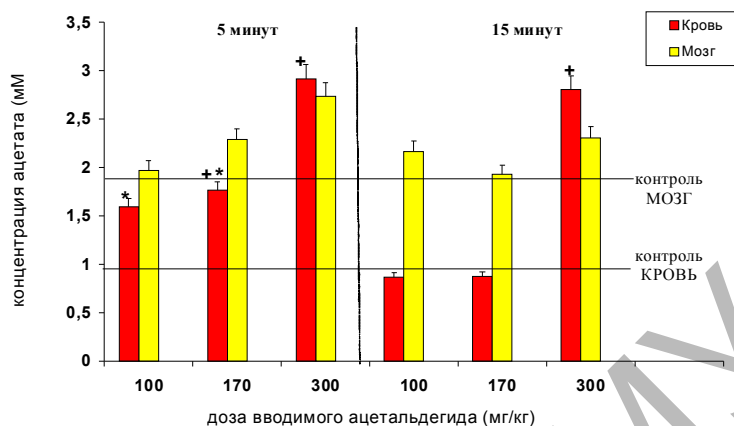


Рис. Концентрация ацетата в крови и мозге мышей линии C57/BL (мМ)

* - $P<0,05$ при сравнении с 15 минутами

+ - $P<0,05$ при сравнении с мозгом

тата.

Литература

1. Зиматкин С.М., Островский Ю.М. Активность альдегиддегидрогеназы в барьерных структурах мозга. / С.М. Зиматкин, Ю.М. Островский // Бюлл. экспериментальной биологии и медицины. – 1988.- № 9. – с. 183 – 184.
2. Hunt W.A. Role of acetaldehyde in the actions of ethanol on the brain – a review. / W. A. Hunt // Alcohol. – 1996.- № 13. – с. 147 -151.
3. Behavioral characterization of acetaldehyde in C57BL/6J mice: locomotor, anxiolytic and amnesic effects. / E. Quertemont, S. Tambour, P. Bernaerts etc.//Psychopharmacology (Berl). – 2004 в печати. - Режим доступа: [http://springerlink.metapress.com/app/home/contribution.asp; 20.09.2004]
4. Sippel H.W. The acetaldehyde content in rat brain during ethanol metabolism. / H.W. Sippel // J.Neurochem. – 1974.- № 23. – с. 451 – 453
5. Smith B.R., Aragon C.M.G., Amit Z. Catalase and the production of brain acetaldehyde: a possible mediator of the psychopharmacological effects of ethanol. / B.R. Smith, C.M.G. Aragon, Z. Amit // Addiction Biology. – 1997.- № 2. – с. 277 -289.
6. Tabakoff B., Anderson R.A., Ritzmann R.F. Brain acetaldehyde after ethanol administration / B. Tabakoff, R.A. Anderson; R.F. Ritzmann / Biochem. Pharmacol. – 1976.- № 25. – с. 1305 -1309.
7. Tottmar O. Biogenic aldehydes: metabolism, binding to brain membranes, and electrophysiological effects. / O. Tottmar // Prog. Clin. Biol. Res. – 1985.- № 183. – с. 51 - 66.
8. Acetaldehyde-induced changes in monoamine and amino acid extracellular microdialysate content of the nucleus accumbens. / R.J. Ward, C. Colantuoni, A. Dahchour etc. // Neuropharmacology. – 1997.- № 36. – с. 225 – 232.
9. Zimatkin S.M., Deitrich R.A. Ethanol metabolism in the brain. / S.M. Zimatkin, R.A. Deitrich // Addiction Biology. – 1997.- № 2. – с. 387 – 399.
10. Relationship of brain ethanol metabolism to the hypnotic effect of ethanol. II: Studies in selectively bred rats and mice. / S.M. Zimatkin, A.V. Liopo, V.I. Satanovskaya etc. // Alcohol Clin.Exp.Res. – 2001.- № 25. – с. 982 – 988.
11. Zimatkin S.M., Lindros K.O. Distribution of catalase in rat brain: aminergic neurons as possible targets for ethanol effects. / S.M. Zimatkin, K.O. Lindros // Alcohol & Alcohol. – 1996.- № 31. – с. 167 -174.