

Молекулярно-биологические проблемы создания лекарственных средств и изучение механизма их действия

© Коллектив авторов, 2005

Ю. Е. Разводовский, Е. М. Дорошенко

ВЛИЯНИЕ L-ТРИПТОФАНА НА ФОРМИРОВАНИЕ ФОНДА ЦЕНТРАЛЬНЫХ НЕЙРОАКТИВНЫХ СОЕДИНЕНИЙ ПРИ ХРОНИЧЕСКОЙ АЛКОГОЛЬНОЙ ИНТОКСИКАЦИИ

Гродненский государственный медицинский университет, Республика Беларусь

Исследовано влияние L-триптофана на фонд центральных нейроактивных соединений на фоне хронической алкогольной интоксикации. Установлено, что хроническая алкогольная интоксикация сопровождается дисбалансом в фонде центральных нейроактивных соединений. Наиболее выраженные сдвиги отмечены в показателях дофаминергической и серотонинергической систем. Внутривенное введение L-триптофана в дозе 100 мг/кг на фоне хронической алкогольной интоксикации корректирует нарушения функционирования серотонинергической системы. Эффекты нормализации показателей дофаминергической системы менее выражены.

Известно, что острая и хроническая алкогольная интоксикация сопровождается нарушением в функционировании ряда нейромедиаторных систем: серотонинергической, дофаминергической, а также системы

возбуждающих и тормозных нейромедиаторов [1, 2]. В последнее время появилось много данных, указывающих на то, что ключевым фактором в патогенезе алкогольной зависимости является дисфункция центральной серотонинергической системы. Так, было установлено, что на фоне хронической алкогольной интоксикации значительно снижается уровень серотонина (5-НТ) в мозге [3]. Уровень метаболита серотонина 5-оксииндолилуксусной кислоты (5-НИАА) в моче и спинномозговой жидкости значительно ниже у алкоголиков по сравнению со здоровыми субъектами [4]. Кроме того, имеются экспериментальные данные, указывающие на то, что подтипы серотониновых рецепторов 5-НТ(1А) и 5-НТ(1В) могут быть вовлечены в развитие толерантности и зависимости от алкоголя [5, 6]. Важным свидетельством, доказывающим вовлеченность 5-НТ в развитие алкогольной зависимости, является исследование препаратов, влияющих на обратный захват 5-НТ (селективные ингибиторы обратного захвата 5-НТ). Экспериментальные и клинические исследования свидетельствуют, что эти препараты снижают потребление алкоголя [7]. Нарушение серотонинергической активности при алкогольной интоксикации может быть опосредовано нарушением доступности предшественника 5-НТ триптофана (Trp). Так, было установлено, что острое введение алкоголя снижает уровень Trp в плазме и его доступность мозгу вследствие активации триптофанпирролазы печени [8]. В связи с потенциальной возможностью использования L-Trp в качестве антиалкогольного препарата представляется обоснованным исследование его влияния на формирование фонда свободных аминокислот и биогенных аминов при хронической алкогольной интоксикации.

Таблица 1
Влияние L-триптофана (100 мг/кг) на содержание (нмоль/г) биогенных аминов, их предшественников и метаболитов, а также нейроактивных аминокислот в гипоталамусе крыс при хронической алкогольной интоксикации

| Соединение | Контроль | Хроническая алкогольная интоксикация | Хроническая алкогольная интоксикация + триптофан (100 мг/кг) |
|------------|--------------|--------------------------------------|--------------------------------------------------------------|
| Tyr | 24,56 ± 4,24 | 44,43 ± 7,59 ¹ | 37,99 ± 7,04 |
| NE | 4,89 ± 0,55 | 5,84 ± 0,67 | 5,71 ± 0,27 |
| E | 0,08 ± 0,03 | 0,24 ± 0,03 ¹ | 0,21 ± 0,02 ¹ |
| DOPAC | 0,09 ± 0,01 | 0,18 ± 0,02 ¹ | 0,13 ± 0,03 ¹ |
| DA | 0,59 ± 0,05 | 0,78 ± 0,05 ¹ | 2,95 ± 0,28 ^{1,2} |
| 5-НИАА | 0,25 ± 0,05 | 0,15 ± 0,01 | 0,70 ± 0,07 ^{1,2} |
| Trp | 8,39 ± 1,15 | 8,00 ± 0,57 | 17,51 ± 0,86 ^{1,2} |
| HVA | 0,86 ± 0,07 | 1,07 ± 0,08 | 0,59 ± 0,07 ^{1,2} |
| 5-НТ | 1,55 ± 0,18 | 1,28 ± 0,06 | 3,59 ± 0,30 ^{1,2} |
| Asp | 2014 ± 384 | 1883 ± 189 | 740 ± 108 ^{1,2} |
| Glu | 7907 ± 1681 | 7082 ± 816 | 4220 ± 377 ^{1,2} |
| Ser | 798 ± 220 | 700 ± 103 | 433,3 ± 52,9 ^{1,2} |
| Gln | 1567 ± 267 | 1471 ± 197 | 2152 ± 282 |
| Arg | 54,8 ± 14,3 | 48,09 ± 4,95 | 138,9 ± 17,2 |
| Gly | 422 ± 167 | 350,2 ± 66,1 | 462,1 ± 69,2 |
| Thr | 609 ± 178 | 448,8 ± 43,8 | 292,4 ± 54,8 |
| PEA | 1238 ± 296 | 1350 ± 187 | 1228 ± 145 |
| Ala | 172,2 ± 27,6 | 129,3 ± 26,5 | 90,8 ± 16,2 |
| β-Ala | 120,8 ± 15,3 | 77,9 ± 11,1 ¹ | 132,1 ± 15,6 ² |
| Tau | 3299 ± 759 | 2362,7 ± 50,07 ¹ | 3626 ± 318 ² |
| GABA | 5931 ± 1835 | 5208 ± 631 | 6267 ± 498 |

Примечание: $p < 0,05$ при сравнении с ¹ — контролем; ² — хронической алкогольной интоксикацией

Таблица 2
Влияние L-триптофана (100 мг/кг) на содержание (нмоль/г) биогенных аминов, их предшественников и метаболитов, а также нейроактивных аминокислот в стриатуме крыс при хронической алкогольной интоксикации

| Соединение | Контроль | Хроническая алкогольная интоксикация | Хроническая алкогольная интоксикация + триптофан (100 мг/кг) |
|------------|----------------|--------------------------------------|--------------------------------------------------------------|
| Tyr | 42,41 ± 4,96 | 38,50 ± 5,59 | 30,68 ± 7,97 |
| NE | 0,52 ± 0,08 | 0,52 ± 0,07 | 0,62 ± 0,23 |
| DOPAC | 1,39 ± 0,26 | 2,25 ± 0,31 | 4,80 ± 0,38 ^{1,2} |
| DA | 63,08 ± 7,63 | 53,87 ± 7,88 | 94,0 ± 15,5 |
| 5-НИАА | 0,24 ± 0,05 | 0,29 ± 0,04 | 0,64 ± 0,14 ^{1,2} |
| Trp | 9,35 ± 0,59 | 9,92 ± 0,72 | 16,02 ± 1,45 ^{1,2} |
| HVA | 1,27 ± 0,12 | 1,66 ± 0,20 | 2,34 ± 0,27 ^{1,2} |
| 3-МТ | 0,52 ± 0,04 | 0,75 ± 0,06 ¹ | 0,65 ± 0,034 |
| 5-НТ | 1,84 ± 0,18 | 1,80 ± 0,23 | 2,88 ± 0,37 ^{1,2} |
| Asp | 2106,8 ± 78,8 | 3374 ± 352 ¹ | 2491 ± 316 |
| Glu | 12136 ± 1577 | 17868 ± 1414 ¹ | 12895 ± 617 ² |
| Ser | 1767,6 ± 76,3 | 2288 ± 189 ¹ | 1642 ± 278 ² |
| Gln | 1121 ± 187 | 1393 ± 242 | 2027 ± 477 |
| Arg | 89,67 ± 4,41 | 107,93 ± 8,49 | 183,63 ± 4,60 ¹ |
| Gly | f 420,6 ± 73,3 | 749 ± 126 ¹ | 977,4 ± 24,9 ¹ |
| Thr | 839,3 ± 72,8 | 896 ± 139 | 962,8 ± 18,7 |
| PEA | 2184 ± 354 | 2457 ± 313 | 1975 ± 130 |
| Ala | 357,7 ± 21,9 | 603,4 ± 54,7 ¹ | 132,5 ± 10,4 |
| β-Ala | 197,2 ± 27,4 | 293,9 ± 45,4 | 135,48 ± 17,3 ² |
| Tau | 12998 ± 659 | 16903 ± 1937 | 15146 ± 1518 |
| GABA | 2873 ± 522 | 2924 ± 296 | 3173 ± 421 |

Примечание: $p < 0,05$ при сравнении с ¹ — контролем; ² — хронической алкогольной интоксикацией

Материалы и методы

Нами исследовано изменение содержания 5-НТ, Trp, 5-НИАА, а также дофамина (DA), тирозина (Tyr), диоксифенилукусной кислоты (DOPAC), норадреналина (NE), адреналина (E), гомованилиновой кислоты (HVA), 3-метокситирамина (3-МТ), гамма-аминомасляной кислоты (GABA), аспартата (Asp), глутамата (Glu), глицина (Gly), таурина (Tau), серина (Ser), аргинина (Arg), глутамина (Gln), треонина (Thr), фосфоэтанолamina (PEA), аланина (Ala), β-аланина (βAla) в различных отделах головного мозга (гипоталамус, ствол, стриатум) на фоне хронической алкогольной интоксикации и введения экзогенного L-Trp.

В эксперименте было использовано 18 (по 6 в каждой группе) белых крыс-самцов Wistar массой 180–200 г, содержащихся на стандартной диете вивария. 15 % раствор этанола служил единственным источником питья на протяжении всего эксперимента, который длился три недели. Экспериментальные животные на протяжении всего срока алкоголизации получали перорально L-Trp в дозе 100 мг/кг 1 раз в сутки. Определение нейроактивных аминокислот, биогенных аминов, их предшественников и метаболитов в отделах головного мозга проводили на ВЭЖХ-системе

Таблица 3
Влияние L-триптофана (100 мг/кг) на содержание (нмоль/г) биогенных аминов, их предшественников и метаболитов, а также нейроактивных аминокислот в стволе мозга крыс при хронической алкогольной интоксикации

| Соединение | Контроль | Хроническая алкогольная интоксикация | Хроническая алкогольная интоксикация + триптофан (100 мг/кг) |
|------------|---------------|--------------------------------------|--------------------------------------------------------------|
| Tyr | 35,73 ± 8,51 | 201,7 ± 85,2 | 59,08 ± 9,65 |
| NE | 1,63 ± 0,18 | 2,05 ± 0,32 | 1,38 ± 0,12 ² |
| DOPAC | 0,06 ± 0,00 | 0,33 ± 0,16 | 0,33 ± 0,03 ¹ |
| DA | 0,36 ± 0,02 | 0,72 ± 0,11 ¹ | 0,79 ± 0,14 ¹ |
| 5-НИАА | 0,50 ± 0,07 | 0,40 ± 0,05 | 1,68 ± 0,33 ^{1,2} |
| Trp | 11,07 ± 1,50 | 10,85 ± 1,18 | 19,33 ± 2,51 ^{1,2} |
| HVA | 0,27 ± 0,06 | 0,29 ± 0,03 | 0,33 ± 0,04 |
| 5-НТ | 1,63 ± 0,22 | 1,220 ± 0,132 ¹ | 2,17 ± 0,17 ² |
| Asp | 999,2 ± 50,7 | 2793 ± 399 ¹ | 1431 ± 230 ² |
| Glu | 3591 ± 443 | 7834 ± 1226 ¹ | 2851 ± 231 ² |
| Ser | 322,7 ± 16,1 | 613,5 ± 52,5 ¹ | 683 ± 131 ¹ |
| Gln | 2161,1 ± 241 | 2590 ± 549 | 2652 ± 598 |
| Arg | 76,72 ± 2,46 | 149,2 ± 14,8 ¹ | 72,8 ± 12,7 ² |
| Gly | 724 ± 111 | 531,6 ± 96,1 | 821 ± 107 ² |
| Thr | 253,7 ± 25,3 | 700 ± 156 ¹ | 590,4 ± 87,8 |
| PEA | 650 ± 104 | 838 ± 126 | 1630 ± 172 ^{1,2} |
| Ala | 91,73 ± 5,92 | 184,0 ± 17,1 ¹ | 162,8 ± 33,0 ¹ |
| β-Ala | 143,1 ± 13,6 | 178,5 ± 22,4 | 58,72 ± 7,11 ^{1,2} |
| Tau | 2128,4 ± 62,4 | 2555 ± 175 ¹ | 2745 ± 205 |
| GABA | 4121 ± 755 | 4975 ± 793 | 9824 ± 1635 ^{1,2} |

Примечание: $p < 0,05$ при сравнении с ¹ — контролем; ² — хронической алкогольной интоксикацией

“Waters-206” (Millipore-Waters, США). Нейроактивные аминокислоты определяли методом обращенно-фазной хроматографии на колонке 3 × 150 мм, Диасорб-130 C₁₆T (8 μм) (Элсико, Россия) с изократическим элюированием после предколоночной дериватизации с *o*-фталевым альдегидом и 2-меркаптоэтанолом и флуориметрическим детектированием (338/425 нм). Биогенные амины, их предшественники и метаболиты определялись методом ион-парной ВЭЖХ на колонке Сепарон SGX C₁₈, (5 μм, 3 × 150 мм) с электрохимическим детектированием [9].

Статистическую обработку данных производили с помощью программного пакета STATISTICA. Значение F константы Фишера для переменной указывает на ее статистическую значимость при дискриминации между совокупностями, то есть она является мерой вклада переменной в предсказании членства в совокупности. Значения статистики Уилкса, лежащие около 0, свидетельствуют о хорошей дискриминации. Значения статистики Уилкса, лежащие около 1, свидетельствуют о плохой дискриминации. Иными словами, если значения лямбда Уилкса близки к 0, то мощность дискриминации близка к 1, если лямбда Уилкса близка к 1, то мощность близка к 0 [10].

Хроническая алкогольная интоксикация сопровождается увеличением содержания Трп, DA, E, DOPAC и снижением уровня β -Ala и Tau в гипоталамусе (табл. 1), повышением уровня 3-МТ, Asp, Glu, Ser, Gly и Ala в стриатуме (табл. 2), а также — увеличением концентрации DA, DOPAC, Glu, Ser, Arg, Asp и снижением уровня 5-НТ в стволе мозга (табл. 3).

В гипоталамусе на фоне хронической алкогольной интоксикации Трп устраняет повышение содержания предшественника катехоламинов Трп, повышает — DA, 5-Н1АА, Трп, 5-НТ, а также β -Ala и Tau и снижает уровень НВА, Asp, Glu и Ser (табл. 1). По данным дискриминантного анализа достигнута 100 % классификация реализаций по группам. Коэффициент лямбда Уилкса равен 0,0003, что свидетельствует о высокой мощности дискриминации. Наиболее информативными показателями согласно значению F — констант Фишера — оказались: Н1АА (13,7), Gly (12,1), Ala (8,8), Asp (6,0), Tau (5,9), НВА (5,9), DA (5,6), 5-НТ (5,5).

В стриатуме триптофан на фоне хронической алкогольной интоксикации достоверно повышает уровень метаболитов DA, а также Ser и устраняет повышение содержания Asp, Glu, Ser и Ala, но не Gly (табл. 2). Нормализация уровня 3-МТ под действием Трп подтверждает выдвинутое выше предположение о том, что модулирующее влияние последнего на активность дофаминовой системы не связано с его действием на скорость синаптического выброса медиатора. С помощью дискриминантного анализа установлено, что реализации классифицируются по группам корректно, т.е. по распределению индивидуальных значений определяемых показателей группы различаются весьма существенно. Коэффициент лямбда Уилкса равен 0,0000, что говорит о хорошей дискриминации. Наиболее информативными показателями, характеризующими фонд исследованных соединений (по значению F — констант Фишера), оказались Tau (14,7), NE (14,1), DOPAC (13,2), 3-МТ (9,1), E (6,9), НВА (6,6).

В стволе мозга введение Трп на фоне хронической алкогольной интоксикации не изменяет концентрацию DA и его метаболитов, однако снижает содержание NE и вызывает увеличение содержания 5-НТ и 5-Н1АА (табл. 3). Влияние Трп на содержание возбуждающих нейромедиаторных аминокислот (Asp, Glu) в стволе

мозга было аналогично таковому в стриатуме. Кроме этого, в стволе мозга под влиянием Трп повышается содержание РЕА, Gly и ГАМК, а также снижается уровень, β -Ala и Arg. По данным дискриминантного анализа достигнута 100 % реализация классификаций по группам. Коэффициент лямбда Уилкса равен 0,0000, что свидетельствует о высокой дискриминации. Наиболее информативными показателями по значению констант F — Фишера являются Трп (39,8), НТР (20,7), NM (16,0), НВА (16,0), Glu (15,2), GABA (12,6), Н1АА (12,1), Tau (12,1).

Таким образом, согласно результатам настоящего исследования, хроническая алкогольная интоксикация характеризуется выраженным дисбалансом в фонде центральных нейроактивных соединений. Наиболее выраженные сдвиги отмечены в показателях серотонинергической системы и отражают ее функциональную недостаточность. Введение Трп корригирует нарушения в функционировании серотонинергической системы. Менее выражены нормализующие эффекты триптофана в отношении дофаминергической системы. Кроме того, на фоне хронической алкогольной интоксикации триптофан повышает отношение концентраций тормозных аминокислот-трансмисмиттеров к возбуждающим во всех исследованных отделах головного мозга за счет влияния на содержание как возбуждающих (в гипоталамусе), так и тормозных (в стриатуме и стволе мозга).

ЛИТЕРАТУРА

1. R. J. Thielen, D. J. Bare, W. J. McBride, et al., *Drug Alcohol Depend.*, **65**(2), 159 – 65 (2002).
2. C. P. Bailey, N. Andrews, A. T. McKnight, et al., *Pharmacol. Biochem. Behav.*, **66**(1), 129 – 136 (2000).
3. P. LeMarauand, R. O. Pihl, T. C. Benkelfat, *Biological. Psychiatry*, **36**(6), 395 – 421 (1994).
4. P. LeMarauand, R. O. Pihl, T. C. Benkelfat, *Biological. Psychiatry*, **36**(6), 326 – 337 (1994).
5. I. T. Uzbay, S. E. Usanmaz, E. S. Akarsu, *J. Rharmacol. Exp. Ther.*, **293**(2), 383 – 389 (2000).
6. D. M. Tomkins, M. F. Oneill, *Clin. Neuropsychiatry*, **5**(2), 125 – 131 (2000).
7. C. A. Naranjo, D. M. Knoke, *Alcohol Res. Health*, **25**(2), 126 – 135 (2001).
8. A. A. Badawy, *Adv. Exp. Med. Biol.*, **398**, 75 – 82 (1996).
9. Е. М. Дорошенко, *Дис. канд. биол. наук*, Минск (1994).
10. В. Боровиков, *Программа STATISTICA для студентов инженеро*, Москва (2001).

Поступила 16.02.04

THE INFLUENCE OF L-TRYPTOPHAN ON THE FORMATION OF A POOL OF CENTRAL NEUROACTIVE COMPOUNDS UNDER THE CONDITION OF CHRONIC ALCOHOL INTOXICATION

Yu. E. Razvodovsky and E. M. Doroshenko

Grodno State Medical University, Grodno, Belarus

The influence of *L*-tryptophan on the pool of central neuroactive compounds under the conditions of chronic alcohol intoxication has been studied. Chronic alcohol administration led to a dysbalance in the formation of the pool of central neuroactive compounds. The most significant changes were observed in characteristics of the central dopaminergic and serotonergic system. The intragastric introduction of *L*-tryptophan in a dose of 100 mg/kg under the conditions of chronic alcohol intoxication alleviated the disturbances in functioning of the serotonergic system. Normalization of the characteristics of dopaminergic system was less pronounced.