

*А.К. Бортникова, Т.И. Панова, В.Н. Казаков***ВЛИЯНИЕ УРОВНЯ ГЛИКЕМИИ НА ПОТРЕБЛЕНИЕ ЭТАНОЛА И ГЛЮКОЗЫ
АЛКОГОЛЬЗАВИСИМЫМИ КРЫСАМИ***Донецкий национальный медицинский университет им. М.Горького, Украина*

Реферат. Дано количественное описание питьевого поведения алкогользависимых крыс. Установлено, что алкогользависимые животные потребляют глюкозы в 8 раз меньше, чем интактные. Предположено, что это происходит из-за снижения активности ферментов гликолиза, вызванного гипогликемией. Длительное принудительное пероральное введение крахмала способствовало устранению гипогликемии, увеличению потребления глюкозы и уменьшению влечения к алкоголю в условиях свободного выбора. Высказано предположение, что алкогольная зависимость — это зависимость мозга от кетоновых тел.

Ключевые слова: алкогользависимые крысы, гипогликемия, утрата гедонических свойств глюкозы, принудительная коррекция гликемии

Для алкоголизма характерна гипогликемия, которая развивается в результате угнетения глюконеогенеза в печени. Метаболизм клеток мозга перестраивается на утилизацию кетоновых тел, которые в избытке образуются в печени из ацетил-КоА. Кетоновые тела — достаточно энергоёмкие топливные молекулы. Окисление одной молекулы бета-гидроксибутирата в итоге даёт 26 молекул АТФ [1]. Поэтому алкогольный кетоз традиционно рассматривается как приспособительная реакция к гипогликемии. В своих исследованиях на алкогользависимых крысах мы неоднократно регистрировали выраженный кетоз [5]. Инициирование продукции кетоновых тел происходит за счёт смещения соотношения НАДФ-Н/НАДФ в сторону избытка НАДФ-Н. В свою очередь, смещение в сторону НАДФ-Н происходит по причине высокой активности алкогольдегидрогеназы в присутствии больших концентраций этанола [1].

Но когда кетоз достигает высоких значений, то из полезной адаптивной реакции превращается в патологическую. У кетоновых тел в больших концентрациях есть ряд негативных эффектов: ацидоз, вплоть до некомпенсированного; высокая осмоактивность, приводящая к дегидратации тканей; нарушение связывания кислорода гемоглобином; ионизация функциональных групп белков плазмы крови с нарушением их конформации и функции; нейротоксичность (тошнота, рвота, недомогание, головная боль) [3]. Поэтому в терапии купирования алкогольного абстинентного синдрома широко применяют антидоты, нейтрализующие кетоновые тела (Зорекс, Унитиол) [3, 6]. При этом врачи отмечают, что подавить кетоз однократным введением антидота невозможно. Поэтому для достижения удовлетворительного эффекта терапевтические схемы рекомендуют двух- и трёхнедельные курсы. Одно-

временно для улучшения питания мозга применяют внутривенную инфузию глюкозы [3,6]. Но после окончания лечения рецидивы употребления алкоголя наблюдаются, по разным данным, у 74-91 % больных [9]. Это позволяет предположить наличие связи между гипогликемией, кетозом, с одной стороны, и влечением к алкоголю, с другой.

Цель работы - выяснить, как повлияет на влечение к этанолу у алкогользависимых крыс устранение гипогликемии и длительное поддержание гликемии на уровне нормы.

При этом мы выбрали два альтернативных способа устранения гипогликемии: 1) предоставление животным свободного неограниченного доступа к поилке с глюкозой; 2) принудительное пероральное введение крахмала.

М а т е р и а л и м е т о д ы

Эксперимент выполнен на 70 крысах обоих полов массой 200-350 г. в осенне-зимний период в условиях вивария с принудительной вентиляцией. Температура в виварии поддерживалась на уровне 18-22°C, что исключало избыточную жажду. Животные содержались по одному в клетке, при свободном доступе к пище. Составу пищи уделяли много внимания и поддерживали его постоянным с той целью, чтобы добиться стабильного питьевого поведения, не провоцируя излишнюю жажду солёной пищей или, наоборот, отказ от питья из-за потребления большого количества сочных фруктов и овощей.

Доступ к питью был не всегда одинаков.

Сначала, в течение одной недели, в каждую клетку были помещены по две поилки — с чистой водой и 5% глюкозой, т.е. у крыс была возможность свободного выбора питья. Регистрировали количество выпитого из каждой поилки. Таким способом выясняли гедонические свойства глюкозы для каждой особи. Точность измерения — 0,5 мл (цена деления на шкале поилки — 0,5 мл).

Затем на протяжении нескольких недель проводили принудительную алкоголизацию: в каждой клетке была только одна поилка — с 10% этанолом. Сроки алкоголизации были разными. Для крыс 1-й группы (n = 20) — 3 недели, 2-й группы (n = 20) — 6 недель, 3-й группы (n = 20) — 16 недель. Животные контрольной группы (n = 10) в качестве питья получали обычную чистую воду.

После окончания указанного срока принудительной алкоголизации у животных в течение трёх недель был свободный выбор между тремя видами питья: водой, 5% глюкозой, 10% этанолом. Критерием сформированной алкогольной зависимос-

ти было предпочтение этанола. Поскольку животные значительно различались между собой в весе, делали пересчет выпитой жидкости на 100 г массы тела. У контрольных крыс в эти три недели был выбор между чистой водой и 5 % глюкозой.

Кроме того, на этом этапе эксперимента каждую из экспериментальных групп разделили на две подгруппы: по 10 особей в каждой подгруппе. Всем крысам два раза в день с интервалом в 8 часов из шприца без иглы *per os* вводили по 1,0 мл жидкости: для животных первых подгрупп это была питьевая вода, а вторых подгрупп – заваренный кисель из 40 % крахмала (в пересчете на глюкозу – это 1,0 г/кг). Выбор крахмала обусловлен тем, что этот сложный полисахарид с разветвленной цепью в желудочно-кишечном тракте расщепляется достаточно долго, образовавшаяся глюкоза всасывается постепенно, что обеспечивает поддержание стабильного уровня глюкозы в крови длительное время и не провоцирует перенапряжение инсулярного аппарата.

При обработке результатов экспериментов использовали пакет MedStat [4].

Так как распределение значений объема выпитой жидкости не отличалось от нормального, то были применены параметрические методы статистического анализа. Для представления данных в работе приводится среднее значение объема выпитой жидкости (мл/100г) и стандартное отклонение s (мл/100г).

В ходе дисперсионного анализа были проведены множественные сравнения по методу Шеффе для определения различий средних между группами и в каждой группе в разные периоды эксперимента. Парные сравнения средних в выборках проводились с использованием критерия Стьюдента, сравнения с контрольной группой с использованием критерия Даннета.

При проведении экспериментов придерживались норм и принципов, утвержденных Постановлением Первого национального конгресса по биоэтике (Киев, 2001), Законом Украины № 3447-IV «Про захист тварин від жорстокого поводження» от 21.02.2006 г., с изменениями № 1759-VI от 15.12.2009 г., Европейской конвенции о защите позвоночных животных, использующихся для научных и иных целей (Страсбург, 1986) [2].

Результаты и обсуждение

До начала эксперимента крысы ежедневно выпивали в среднем по $2,5 \pm 0,6$ мл/100г веса чистой воды. Разброс между минимальным и максимальным потреблением воды в разные дни для каждой особи составил не более 2,3 мл на 100 граммов веса, что свидетельствует о стабильном поведении, определяемом сбалансированным пищевым рационом. Кроме того, животные ежедневно выпивали глюкозы по $1,6 \pm 0,6$ мл /100г веса. Следует подчеркнуть, что раствор глюкозы животные потребляли при наличии чистой воды в клетке. Это свидетельствует о гедонических свойствах глюкозы. Суммарный объем выпитой жидкости составил в среднем $3,9 \pm 1,1$ мл/100г веса животного. Данные питьевого режима у крыс до алкоголизации и на момент окончания контрольных периодов принудительной алкоголизации представлены в рис. 1.

Потребление этанола в ходе принудительной алкоголизации было следующим. В первые семь дней животные выпивали в среднем по $3,1 \pm 0,7$ мл/100г веса. Мы полагаем, что небольшое снижение общего количества потребляемого питья (до алкоголизации это было $3,9 \pm 1,1$ мл/100г веса) можно объяснить неприятным вкусом этанола для крыс.

Дальнейший анализ питьевого режима крыс по результатам позволил предположить, что при развитии алкогольной зависимости изменения в метаболизме клеток накапливаются не линейно, а скачкообразно (рис. 1). По нашим наблюдениям, скачок происходит на 3 и 6 неделях алкоголизации, потому что наибольшие изменения в поведении (по показателям выпитого раствора этанола и глюкозы) были отмечены в эти временные периоды.

К концу третьей недели количество потребляемого этанола возросло ($p < 0,001$) до $4,9 \pm 0,8$ мл/100г веса, что, вероятно, свидетельствует об адаптации.

К концу шестой недели произошел еще один «скачок» потребления раствора этанола – до $6,4 \pm 0,9$ мл/100 г веса животного. В среднем, количество выпитого, по сравнению с показателями на третьей неделе, возросло в 1,3 раза ($p < 0,001$).

В то же время в ходе эксперимента было отмечено, что потребление алкоголя на шестой неделе было своего рода «потолком» потребления, поскольку дальнейшее удлинение срока алкоголизации принципиальных изменений в поведении не повлекло. При сравнении средних значений показателей выпитого этанола от недели к неделе, вплоть до шестнадцатой, уровень потребления оставался стабильным. И при сравнении показателей количества выпитого алкоголя в конце шестой и шестнадцатой недель не было выявлено статистически значимых различий ($p=0,712$). Стабильность потребления этанола в этот период свидетельствует о сформировавшейся алкогольной зависимости.

Обращает на себя внимание факт временного формирования «потолка» потребления – к концу шестой недели принудительной алкоголизации. С нашей точки зрения, это может быть обосновано минимальным временем принудительной алкоголизации (см. рис. 1 А).

В процессе алкоголизации ежесуточное общее потребление питья по сравнению со здоровыми крысами увеличивалось, и к концу 16 недели превысило показатели здоровых животных в 1,8 раза (см. рис. 1 Б). Вероятно, повышенная жажда вызвана осмотическими свойствами этанола и его метаболита – ацетальдегида.

Наблюдения за потреблением глюкозы показали, что у алкогользависимых крыс глюкоза утрачивает свои гедонические свойства. Вывод сделан на основании того, что у этих животных уменьшается предпочтение глюкозы по сравнению со здоровыми особями. Наши наблюдения согласуются с данными других исследователей, показавших, что у крыс со сформированной зависимостью не уменьшалось предпочтение алкоголя при возможности свободного выбора между алкоголем и подслащенной сахаром обычной питьевой водой [7, 8]. В ходе эксперимента было

отмечено, что продолжительность алкоголизации, а следовательно, и степень зависимости, влияют на количество употребляемой глюкозы: чем дольше алкоголизация (3–6–16 недель), тем меньше животные потребляли глюкозы в условиях свободного выбора. При сравнении показателей питьевого режима по глюкозе от одного отчётного периода к другому статистически значимо снижается уровень её потребления (табл. 1). И к концу 16 недели алкоголизации показатели потребления глюкозы в условиях свободного выбора в среднем в 8 раз ниже, чем у здоровых животных (рис. 1).

Почему же алкоголизованные крысы «перестают любить» глюкозу? Ведь глюкоза является излюбленным лакомством практически для всех млекопитающих (вероятно, по причине, что это единственный питательный субстрат для клеток мозга). Мы полагаем, что одним из объяснений может быть снижение функциональной активности ферментов гликолиза. Согласно общепринятому принципу обратных связей, уменьшение количества субстрата неизбежно влечёт за собою уменьшение и активности, а затем и количества ферментов, воздействующих на этот субстрат. В отсутствие глюкозы метаболизм нейронов перестраивается на синтез макроэргов путём окисления кетоновых тел. Мы же предполагаем, что в результате длительной алкоголизации мозг не только переходит на питание кетоновыми телами, но и теряет способность утилизировать глюкозу. Именно поэтому, глюкоза «за ненадобностью», утрачивает свои гедонические свойства для алкоголизованных животных.

Этанол стимулирует синтез кетоновых тел в печени. Биохимия печени такова, что образуется замкнутый порочный круг: избыток этанола ведёт к гипогликемии > гипогликемия ведёт к кетозу > для кетоза необходим этанол. Кетоновые тела становятся единственным стабильным

питательным веществом для мозга. Возможно, поэтому алкогользависимые крысы «требуют» только кетоновых тел и отказываются от глюкозы, независимо от степени гипогликемии.

Таким образом, мы предлагаем взглянуть на проблему таким образом: суть алкоголизма – в зависимости мозга не от этанола, а от кетоновых тел.

После окончания алкоголизации мы наблюдали питьевое поведение животных ещё три недели. Количество потребляемого питья во всех группах и подгруппах было разным (табл. 1–3). Это зависело от трёх факторов:

- продолжительности предварительной принудительной алкоголизации,
- времени, прошедшего после окончания принудительной алкоголизации,
- принудительного введения раствора крахмала per os.

Анализ данных в таблицах 1–3 позволяет сделать ряд предположений.

При сравнении уровней потребления глюкозы в один отчётный период, во вторых подгруппах 1 и 2 групп они были статистически значимо меньше, чем аналогичные показатели в первых подгруппах. Это, вероятно, связано с тем, что крысы вторых подгрупп получали глюкозу (крахмал) дополнительно per os.

При всех прочих равных условиях (одинаковая продолжительность алкоголизации, её окончание, свободный доступ ко всем видам питья) во вторых подгруппах потребление этанола в течение трёх недель уменьшается в более значимой степени, чем в первых. Уже на второй неделе (а в 1 и 2 группах даже на первой) метаболической коррекции уровня гликемии во вторых подгруппах всех опытных групп уровень потребления этанола статистически значимо снизился по сравнению с аналогичными показателями в первых подгруппах (в которых крысы не получали крахмал).

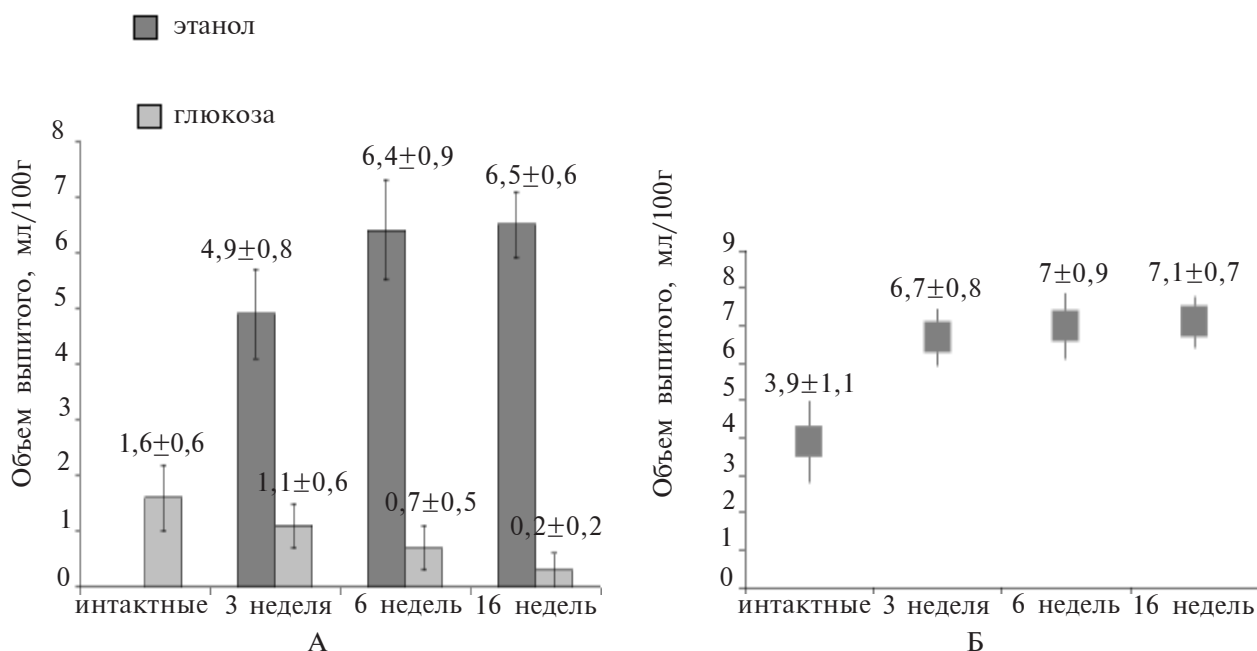


Рис 1. Динамика потребления 5% глюкозы и 10% этанола (А) и суммарного объема выпитой жидкости (Б) в разные периоды принудительной алкоголизации

Таблица 1. Количество потребляемого питья после окончания 3-недельной принудительной алкоголизации крыс 1 группы в условиях свободного выбора

Подгруппа	Питьевые условия	Недели после окончания алкоголизации	Количество выпитого, мл			
			Вода	Глюкоза 5 %	Этанол 10 %	Суммарно
1-я n = 10	Свободный выбор	Одна	0,6±0,7	1,1±0,6	4,9±0,7	6,6±0,9
		Две	0,6±0,5	1,5±0,5	4,4±0,4	6,7±0,6
		Три	1,0±0,6	1,7±0,4	3,9±0,5	6,7±1,0
2-я n = 10	Свободный выбор и крахмал per os	Одна	2,1±0,4	0,8±0,4 *	2,1±0,7 *	5,4±0,8
		Две	2,7±0,8	0,6±0,5 *	1,2±0,6 *#	4,5±0,7 *
		Три	3,2±0,5	0,7±0,6 *	0,6±0,4 *@	4,5±0,8 *

Примечание: статистически значимые различия, $p < 0,001$, по сравнению с показателями в тот же временной период в 1 группе; # - статистически значимые различия, $p < 0,001$, по сравнению с показателями во 2-й подгруппе через 1 неделю после окончания алкоголизации; @ - статистически значимые различия, $p < 0,001$, по сравнению с показателями во второй подгруппе через 2 недели после окончания алкоголизации.

Причём продолжительность метаболической коррекции раствором крахмала имеет значение: чем она длительнее, тем меньше влечение к алкоголю. Это видно из динамики потребления этанола внутри вторых подгрупп с первой по третью неделю. К концу второй недели алиментарной коррекции уровень потребления во вторых подгруппах всех групп снизился ($p < 0,001$) по сравнению с аналогичными показателями на первой неделе, и к концу третьей недели показатели потребления этанола были ниже ($p < 0,001$), чем на второй неделе.

Полученные результаты позволяют предположить, что принудительный избыток глюкозы в организме (при алиментарной коррекции уровня гликемии) способствует восстановлению активности ферментов гликолиза. Кетоновые тела в этих условиях «становятся ненужными». По-

этому отпадает нужда и в этаноле, как в стимуляторе кетонообразования.

С предлагаемой позиции достаточно легко объяснить и описанную выше закономерность: продолжительность принудительной алкоголизации (а следовательно, и степень зависимости) напрямую влияет на количество употребляемой глюкозы: чем дольше алкоголизация (3-6-16 недель), тем меньше крысы потребляли глюкозы в условиях свободного выбора (рис. 1).

К аналогичным выводам пришли и другие исследователи. Не отрицая важности гедонических стимулов, сделан вывод, что они, вероятно, могут выступать раздражителями для подкрепляющей системы только в здоровом мозге или на ранних этапах формирования зависимости, но совершенно утрачивают своё значение как раздражители на более поздних стадиях [7, 8].

Таблица 2. Количество потребляемого питья после окончания 6-недельной принудительной алкоголизации крыс 2 группы в условиях свободного выбора

Подгруппа	Питьевые условия	Недели после окончания алкоголизации	Количество выпитого, мл			
			Вода	Глюкоза 5 %	Этанол 10 %	Суммарно
1-я n = 10	Свободный выбор	Одна	0,5±0,4	0,7±0,5	6,4±0,8	7,0±0,6
		Две	0,8±0,7	0,5±0,8	5,9±0,8	6,5±1,0
		Три	1,0±0,7	0,7±0,7	6,1±0,5	6,4±0,8
2-я n = 10	Свободный выбор и крахмал per os	Одна	1,6±0,5	0,4±0,6 *	3,9±0,6 *	5,6±0,8 *
		Две	1,7±0,7	0,3±0,6 *	2,1±0,5 *#	4,3±0,7 *
		Три	2,1±1,0	0,4±0,5 *	1,9±0,5 *@	4,4±0,9 *

Примечание: статистически значимые различия, $p < 0,001$, по сравнению с показателями в тот же временной период в 1 группе; # - статистически значимые различия, $p < 0,001$, по сравнению с показателями во 2-й подгруппе через 1 неделю после окончания алкоголизации; @ - статистически значимые различия, $p < 0,001$, по сравнению с показателями во второй подгруппе через 2 недели после окончания алкоголизации

Таблица 4. Количество потребляемого питья после окончания 16-недельной принудительной алкоголизации крыс 3 группы в условиях свободного выбора

Подгруппа	Питьевые условия	Недели после окончания алкоголизации	Количество выпитого, мл			
			Вода	Глюкоза 5%	Этанол 10%	Суммарно
1-я n = 10	Свободный выбор	Одна	0,8±0,3	0,2±0,2	6,5±0,6	7,1±0,8
		Две	0,9±0,5	0,2±0,1	6,3±0,4	7,0±0,5
		Три	0,9±0,4	0,3±0,1	6,4±0,5	7,1±0,7
2-я n = 10	Свободный выбор и крахмал per os	Одна	1,2±0,6	0,1±0,1	5,5±0,6	5,9±0,8 *
		Две	1,4±0,4	0,1±0,1	3,1±0,6 *#	4,9±0,7 *
		Три	1,6±0,5	0,2±0,2	2,7±0,7 *@	4,7±0,9 *

Примечание: статистически значимые различия, $p < 0,001$, по сравнению с показателями в тот же временной период в 1 группе; # - статистически значимые различия, $p < 0,001$, по сравнению с показателями во 2-й подгруппе через 1 неделю после окончания алкоголизации; @ - статистически значимые различия, $p < 0,001$, по сравнению с показателями во второй подгруппе через 2 недели после окончания алкоголизации

Таким образом, гипогликемия не является непосредственной причиной влечения к алкоголю на стадии сформированной алкогольной зависимости. Алкогользависимые крысы отвергают предлагаемую в питье глюкозу, а продолжительное принудительное введение глюкозы способствует ослаблению влечения к алкоголю.

A.K. Bortnikova, T.I. Panova, V.N. Kazakov
Effect Glycemic Level on Consumption of Ethanol and Glucose by Alcohol-Dependent Rats

A quantitative description of the behavior of drinking alcohol-dependent rats is given. It was found that the alcohol-dependent animals consume glucose 8 times smaller than healthy ones. It is suggested that this is due to decreased activity of enzymes of glycolysis caused by hypoglycemia. Prolonged forced oral administration of starch promoted the elimination of hypoglycemia, increased glucose consumption and reduce the craving for alcohol in a free choice. It is assumed that alcohol addiction depends on ketone bodies (University clinic. — 2013. — Vol.9, №2. — P. 169-173).

Key words: alcohol-dependent, rats, hypoglycemia, loss of hedonic properties of glucose, forced correction of glycemia.

Г.К. Бортнікова, Т.І. Панова, В.М. Казаков
Вплив рівня глікемії на споживання етанолу та глюкози алкогользалежними щурами

Дано кількісний опис питної поведінки алкогользалежних щурів. Встановлено, що алкогользалежні тварини споживають глюкози в 8 разів менше, ніж здорові. Припущено, що це відбувається через зниження активності ферментів гліколізу, викликаного гіпоглікемією. Тривале

примусове пероральне введення крохмалю сприяло усуненню гіпоглікемії, збільшенню споживання глюкози і зменшенню потягу до алкоголю в умовах вільного вибору. Робиться припущення, що алкогольна залежність — це залежність від кетонів тел (Університетська клініка. — 2013. — Т.9, №2. — С. 169-173).

Ключові слова: алкогользалежні щури, гіпоглікемія, втрата гедоничних властивостей глюкози, примуслива корекція глікемії.

ЛІТЕРАТУРА

1. Биохимия. Учебник для вузов, под ред. Е.С. Северина / М., ГЭОТАР Медиа, 2003. — 779 с.
2. Європейська конвенція про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних та інших наукових цілей / Страсбург, 18 березня 1986 року: Збірка договорів Ради Європи: Українська версія // Є.М. Вишневський (пер. та ред.). — К.: Парламентське видавництво, 2000. — 654 с.
3. Наркологія, за ред. проф. О.К. Напреєнка / О.К. Напреєнка, Л.В. Животовська, Н.Ю. Петрина, Л.В. Рахман - Київ, Здоров'я, 2011. — 208 с.
4. Основы компьютерной биостатистики: анализ информации в биологии, медицине и фармации статистическим пакетом MedStat / Лях Ю.Е., Гурьянов В.Г., Хоменко В.Н., Панченко О.А. - Донецк: Издатель Папакица Е.К., 2006. — 211 с.
5. *Панова Т.И.* Алкогольный кетоз как причина зависимости. Экспериментальное исследование / Т.И. Панова / Архив клинической и экспериментальной медицины. — 2013. — Т. 22, № 1. — С. 14-19.
6. *Сиволан Ю. П.* К вопросу о рациональном лечении в наркологии. — Наркология. — 2011. — № 12. — С. 79-81.
7. *Lesscher H.M., Houthuijzen J.M., Groot Koerkamp M.J. et al.* Amygdala 14-3-3z as a novel modulator of escalating alcohol intake in mice. — PLoS One. — 2012. — Vol. 7, № — P. 5.
8. *Vendruscolo L.F., Barbier E., Schlosburg J.E.* [et al]. Corticosteroid-dependent plasticity mediates compulsive alcohol drinking in rats. // J. Neurosci. — 2012. — Vol. 32, — № 22. — P. 7563-7571.
9. *Mertens J.R.* Ten-year stability of remission in private alcohol and drug outpatient treatment: non-problem users versus bsters / J.R. Mertens, A.H. Kline-Simon, K.L. Delucchi, C. Moore, C.M. Weisner // Drug Alcohol Depend. — 2012. — Vol. 125, № 1-2. — P. 67-74.