

Активность ацетилхолинэстеразы в структурах головного мозга и содержание биогенных моноаминов в крови крыс при длительной интоксикации парами ацетона

ТИТКОВА А. М.

к.б.н., в.н.с. лаб. нейрофизиологии и иммунологии Института неврологии,
психиатрии и наркологии АМН Украины, Харьков

ХАРИТОНОВА С. М.

м.н.с. лаб. нейрофизиологии и иммунологии Института неврологии,
психиатрии и наркологии АМН Украины, Харьков

Исследования проведены на модели интоксикации крыс парами ацетона в двух режимах (по 5 мин в течение 13 дней и по 10 мин в течение 17 дней). Лишение животных ацетона и применение блокады периферических рецепторов обонятельного анализатора позволили выявить особенности изменений холинергической регуляции и роль этих нарушений в развитии состояний зависимости от ингалянта и толерантности к нему. Показано участие периферических гормонально-медиаторных механизмов адаптации в стабилизации приобретенных патологических изменений.

Введение

Будучи одной из древних сенсорных функций, обоняние играет существенную роль в процессах жизнедеятельности и адаптации организма человека и животных, являясь важной составляющей эмоционального поведения и механизмом его модуляции путем воздействия на структуры лимбической системы [3, 16]. Это определяет возможность вовлечения обонятельных путей в процессы формирования естественных и приобретенных мотиваций, на базе которых возникают и состояния патологической зависимости [1, 4]. Холинергическая медиация — неотъемлемая составляющая центрального контроля функций организма — участвует наряду с другими нейромедиаторными системами в запуске неспецифической активирующей системы головного мозга и регуляции механизмов эмоционального подкрепления. По мнению ряда исследователей, центральные холинергические механизмы в большей степени связаны с отрицательным компонентом эмоционального реагирования [2, 5]. Холинергические нейроны имеют обширное представительство в структурах неокортекса и обонятельного мозга, а также играют существенную роль в активации двух важнейших адаптационных систем — симпатoadреналовой и гипоталамо-гипофизарно-кортикоадреналовой [7, 15]. Эти обстоятельства показывают, что независимо от способа вовлечения (центрального или периферического, прямого или опосредованного другими нейрохимическими механизмами) холинергический нейромедиаторный компонент вносит существенный вклад в формирование состояния наркотической зависимости [9, 13, 19].

Цель настоящего исследования — изучение роли холинергических процессов в механизмах функционирования обонятельного анализатора и развитии состояния зависимости от летучих органических соединений (ЛОС) на модели ацетоновой интоксикации.

Материал и методы исследования

Исследования выполнены на 52 белых беспородных крысах-самцах позднего пубертатного возраста массой тела 150—180 г. Животные в эксикаторе попарно подвергались воздействию паров ацетона (1 мл раствора): одна

группа — в течение 5 мин, другая — в течение 10 мин на протяжении 13 и 17 дней соответственно. Часть животных в обеих группах в последние двое суток лишалась воздействия ацетона. В другой партии крыс у животных последние 7 дней ежедневно осуществляли блокаду периферических рецепторов обонятельного анализатора путем аппликации насыщенного раствора КС1 на эпителий слизистой носа. На этом фоне производили ингаляцию животных парами ацетона. Контрольную группу составили животные, находившиеся в тех же условиях, что и подопытные, но не подвергавшиеся воздействию ацетоном.

В структурах головного мозга (фронтальная кора, обонятельные луковицы и бугорки, преопитическая область гипоталамуса, гипоталамус, безымянная субстанция, миндалина, гиппокамп, ретикулярная формация ствола головного мозга) и в плазме крови крыс определяли активность ацетилхолинэстеразы (АХЭ) [10], изменения которой отражали изменения функционального состояния холинергической системы и коррелировали с содержанием свободного медиатора [7]. В цельной крови исследовали содержание биогенных моноаминов (дофамина, норадреналина, адреналина, серотонина, гистамина) и аминокислот-предшественников (тирозина и триптофана) [11]. Результаты обработаны статистически с использованием программы Excel.

Результаты и их обсуждение

Наблюдения за поведением животных показали, что у контрольных крыс возникают ориентировочные реакции в первые минуты нахождения в эксикаторе. Со временем эти реакции ослабевают. Животные, подвергавшиеся воздействию ацетоном ежедневно по 5 мин в течение 13 дней, в первые дни также проявляли ориентировочную активность, принюхивались. На 3—4-е сутки у некоторых крыс появлялись реакции встряхивания, которые усиливались в ходе эксперимента. Более длительная экспозиция с ацетоном (по 10 мин в течение 17 дней) вызывала появление реакции встряхивания уже на 2-е сутки воздействия у 15% крыс, а на 10-е сутки — у 45%. Проведение блокады периферических рецепторов обонятельного анализатора усиливало проявления реакции встряхивания,

которая может отражать активацию центральных возбуждающих рецепторов серотонина 5-HT₂ типа [8]. Таким образом, воздействие паров ацетона может приводить к стимуляции центральных возбуждающих рецепторов серотонина и тем самым — к повышению возбудимости структур лимбической системы [14, 17]. Другой отличительной чертой поведения животных при более продолжительном воздействии ацетона было появление состояния сонливости на 9—10-й день (у 85% крыс). К концу эксперимента все животные спали в эксикаторе под воздействием ацетона от 2 до 9 мин при экспозиции 10 мин.

Изучение активности АХЭ в структурах головного мозга крыс, результаты которого представлены в табл. 1, показало, что воздействие паров ацетона в течение 13 дней приводит к активации холинергических процессов в обонятельных луковицах (первом центральном звене в структуре обонятельного анализатора) и гиппокампе (области мозга, осуществляющей анализ обонятельной информации), при одновременном их ослаблении — в гипоталамусе. При отмене ацетона активность АХЭ в обонятельных луковицах еще более возрастала. Выявлялось также повышение активности фермента в преоптической области гипоталамуса (месте локализации холинергических нейронов, дающих проекции в неокортекс и обонятельные луковицы) и, как следствие, — в передних отделах неокортекса (на 26% — при сравнении с эффектом ацетоновой интоксикации). В гиппокампе в состоянии отмены отмечены противоположные изменения — снижение холинэстеразной активности. Наблюдалось также восстановление активности фермента в гипоталамусе.

Характер выявленных изменений активности АХЭ показывает, что при отмене ацетона после длительного воздействия им у животных возникает реакция «отдачи» (rebound), в которую холинергические процессы в изученных структурах головного мозга включаются в разной степени. Наиболее чувствительными к воздействию паров ацетона оказались холинорецептивные структуры обонятельных луковиц и гиппокампа. Увеличение активности АХЭ в преоптической области и обонятельных луковицах (до 148 и 206% соответственно по сравнению со 100% в контроле) может указывать на повышение чувствительности основных глутаматергических нейронов обонятельных луковиц и усиление их холинергической модуляции

при отсутствии привычного воздействия ингалянта. Изменения холинэстеразной активности в гиппокампе отражают в большей степени влияния со стороны лимбико-ретикулярных структур. Выявленная реакция этих структур на отмену ацетона свидетельствует об их преимущественном вовлечении в процесс формирующейся токсической зависимости. При этом гипоталамус крыс как центр вегетативной регуляции, по-видимому, является более устойчивой структурой благодаря своевременному подключению механизмов адаптивного реагирования.

Более продолжительная интоксикация крыс ацетоном приводила к дальнейшему развитию состояния зависимости. Активация холинергических механизмов на уровне мезэнцефалической ретикулярной формации головного мозга и преоптической области гипоталамуса, а также ослабление активности АХЭ в гиппокампе отмечались уже непосредственно после воздействия паров ацетона (табл. 2). Однако при этом в обонятельных луковицах и гипоталамусе не происходило изменений активности АХЭ, а в области фронтальной коры наблюдалось снижение активности фермента. Эти данные демонстрируют развитие толерантности к воздействию паров ацетона. Механизм этого процесса неясен, но, по-видимому, он включает реакции торможения высвобождения ацетилхолина, что и приводит к ослаблению активности АХЭ. О такой возможности косвенно свидетельствует поведение животных — развитие состояния сонливости, что можно объяснить снижением активации неокортекса ацетилхолином.

При отмене ацетона в этой группе животных имело место некоторое ослабление повышенной активности АХЭ в преоптической области и ретикулярной формации ствола головного мозга при более выраженном (до 55%) снижении во фронтальной коре. Восстановление уровня активности фермента в гиппокампе, по-видимому, носило компенсаторный характер. Необходимо отметить, что в области переднего мозга имеется еще одна группа холинергических нейронов, иннервирующих кору головного мозга, которая располагается в ядрах безымянной субстанции. Указанные нейроны, как и нейроны преоптической области, участвуют в механизмах подкрепления, но в большей степени вовлекаются в процесс неспецифической тонической активации неокортекса [6, 12]. Возмож-

Таблица 1

Активность АХЭ (нмоль/мг белка/мин) в структурах головного мозга крыс после 13-дневного воздействия ацетона и его отмены ($M \pm m$; $n = 6-10$)

Структура	Контроль	Ацетон	Отмена ацетона
Обонятельные луковицы	7,6 1,8	12,5 1,0*	15,7 2,1*
Обонятельные бугорки	16,6 1,9	16,4 1,3	18,1 0,9
Фронтальная кора	9,4 0,9	8,4 0,7	10,8 1,2
Гипоталамус	22,0 2,2	16,1 1,4*	22,9 1,8
Гиппокамп	12,2 0,7	16,1 0,9	9,5 0,7*
Преоптическая область	16,9 2,8	20,1 2,9	25,0 3,1
Безымянная субстанция	25,8 3,1	27,6 3,3	25,2 2,7
Миндалина	11,0 1,8	9,3 1,2	11,2 0,8

Примечание. * — $P < 0,05$ при сравнении с контролем

но, что недостаточный уровень холинергической активации коры головного мозга при отмене ацетона является также следствием ослабления импульсации нейронов безымянной субстанции. Таким образом, длительные ингаляции парами ацетона могут приводить к возникновению необратимого дефицита механизмов холинергического возбуждения в области неокортекса.

Однако пути воздействия ЛОС не ограничиваются активацией периферических рецепторов обонятельного анализатора. Эти вещества попадают в кровь, тем самым осуществляя свое влияние не только на центральные, но и на периферические механизмы регуляции функций организма.

Ингаляции животных парами ацетона на фоне блокады периферических рецепторов обонятельного анализатора путем аппликации насыщенного раствора КСI на эпителий слизистой носа при сохранении периферических путей воздействия ацетона через кровь не вызывали изменений, характерных для возбуждения обонятельных рецепторов и изменений холинэстеразной активности в центральных структурах обонятельного анализатора: в обонятельных луковицах, преоптической области и гиппокампе. Исключением явилось сохранение повышенного уровня активности АХЭ в ретикулярной формации ствола головного мозга и пониженного — во фронтальной коре. Однако это не препятствует развитию толерантности к ацетону холинергических процессов на уровне коры головного мозга. Поэтому периферический путь воздействия ингалянтов следует считать важным дополнительным (дублирующим) звеном в развитии патологической зависимости от ЛОС.

В связи с этим представлялось интересным изучить влияние ацетона на содержание биогенных моноаминов и активность АХЭ в крови животных. Результаты показали, что в обеих постановках эксперимента изменения содержания биогенных моноаминов имели одинаковую направленность и степень выраженности, поэтому мы сочли возможным объединить эти данные (табл. 3). Как видно из таблицы, в крови животных, подверженных воздействию ацетоном, происходит повышение уровня всех кате-

холаминов в 1,5—2 раза, что свидетельствует о напряженности функционирования периферических адаптивных процессов с большой долей нагрузки на адренергическое звено мозгового слоя надпочечников.

При отмене ацетона изменения изученного гормонально-медиаторного профиля носили иную направленность. На фоне повышения уровня тирозина и дофамина отмечено снижение концентрации адреналина до 51 %, т.е. *rebound*-реакция выражалась в ослаблении функции симпатoadренальной системы, особенно ее гормонального звена. Направленность наблюдаемых изменений показывает, что это может происходить вследствие торможения превращения катехоламинов на этапе синтеза норадреналина, т.е. за счет снижения активности дофамин-гидроксилазы. Как известно, такой характер изменений в синтезе катехоламинов связывают с наличием острой психопатической симптоматики в клинике шизофрении, алкоголизма, токсических психозов [20]. В крови крыс, лишенных воздействия ацетоном, обнаружено также повышение содержания триптофана и серотонина до 190 и 286 % соответственно. Факт активации периферического звена серотонинергической системы, по-видимому, демонстрирует включение механизмов компенсаторного функционально-метаболического напряжения, возникающего при формировании состояния зависимости от ЛОС. К настоящему времени установлена роль триптофана и серотонина в редукции депрессивной симптоматики, в частности состояний тревожности [18].

Ингаляции ацетона на фоне блокады периферических обонятельных рецепторов приводили к менее выраженной активации высвобождения в кровь тирозина, дофамина, триптофана и серотонина, при резкой стимуляции — норадреналина (до 253 %). Эти данные показывают, что при длительной интоксикации парами ацетона центральные механизмы обонятельного анализатора вносят свой вклад в регуляцию состояния вегетативной нервной системы, в частности принимая участие в ослаблении активации ее симпатического звена. С другой стороны, состояние, вызванное блокадой периферических обонятельных рецепторов, можно рассматривать как стресс-реак-

Таблица 2

Активность АХЭ (нмоль/мг белка/мин) в структурах головного мозга крыс после длительного воздействия ацетона (по 10 мин 17 дней), после его отмены и после воздействия на фоне блокады периферических обонятельных рецепторов (ОР) ($M \pm m$; $n = 6-14$)

Структура	Контроль	Ацетон	Отмена ацетона	Блокада ОР + ацетон
Обонятельные луковицы	9,9 1,5	11,3 1,7	10,2 1,1	10,4 1,3
Обонятельные бугорки	28,1 4,2	28,9 4,2	20,2 5,4	31,7 2,8
Фронтальная кора	16,5 1,1	11,9 0,7*	9,0 1,6*	11,3 0,8*
Гипоталамус	30,0 3,9	27,4 1,4	29,4 3,6	27,3 3,7
Гиппокамп	17,2 0,5	14,9 0,8*	17,9 2,2	17,6 1,4
Преоптическая область	18,6 0,8	41,7 4,2*	38,9 3,6*	25,2 3,8
Безымянная субстанция	33,7 1,9	39,6 5,6	23,4 3,1	27,5 3,3
Миндалины	13,5 0,5	16,8 2,8	11,6 1,4	16,0 1,8
Ретикулярная формация среднего мозга	21,6 1,1	33,9 0,6*	26,2 2,0	25,4 1,8

Примечание. * — $P < 0,05$ при сравнении с контролем; ОР — обонятельный рецептор

Содержание биогенных моноаминов, аминокислот-предшественников и АХЭ в крови крыс при двух режимах воздействия ацетоном, после отмены ацетона и после воздействия на фоне блокады периферических рецепторов обонятельного анализатора ($M \pm m$; $n = 6-14$)

Структура	Контроль	Ацетон	Отмена ацетона	Блокада ОР + ацетон
Тирозин, мкмоль/л	13,0 1,4	14,9 2,0	19,2 2,2*	13,6 1,5
Дофамин, нмоль/л	75,0 8,0	153,0 46,0*	142,0 24,0*	111,0 15,0*
Норадреналин, нмоль/л	40,0 5,4	82,0 15,0*	44,0 6,1	102,0 20,0*
Адреналин, нмоль/л	45,0 6,3	67,0 11,0*	23,0 2,6*	62,0 9,8*
Триптофан, мкмоль/л	14,0 1,1	13,1 2,2	26,5 4,0*	14,3 1,8
Серотонин, нмоль/л	684,0 36,0	779,0 206,0	1955,0 457,0*	1013,0 168,0*
Гистамин, нмоль/л	1394,0 95,0	1336,0 160,0	1467,0 170,0	1273,0 89,0
АХЭ ¹⁾ , нмоль/мг белка/л	1,8 0,1	1,7 0,2	1,7 0,1	—
АХЭ ²⁾ , нмоль/мг белка/л	2,6 0,1	3,7 0,3*	3,8 0,4*	3,5 0,2*

* — $P < 0,05$ при сравнении с контролем; ОР — обонятельный рецептор; АХЭ¹⁾ — активность АХЭ при менее длительной интоксикации ацетоном; АХЭ²⁾ — активность АХЭ при более длительной интоксикации ацетоном

цию на депривацию обонятельной информации. В этом смысле такая реакция отличается от реакции на депривацию ацетона отсутствием эффекта подавления секреции адреналина.

Ингаляции животных ацетоном по 5 мин на протяжении 13 дней не приводили к изменениям активности АХЭ в крови. При более продолжительном воздействии (по 10 мин в течение 17 дней) отмечено повышение активности фермента, что можно расценивать как проявление напряженности функционирования обоих звеньев вегетативной нервной системы. Таким образом, и на протяжении интоксикации ацетоном, и при прекращении ацетоновых ингаляций периферические адаптивные системы находятся в состоянии напряженного функционирования с разной степенью вовлечения составляющих компонентов. В такой ситуации центральные механизмы формирования патологической зависимости оказываются под стабильным модулирующим воздействием со стороны периферических механизмов адаптации.

Заключение

Обобщая полученные данные, можно сказать, что длительное воздействие паров ацетона активирует холинергические структуры переднего мозга, которые, по-видимому, принимают участие в механизме положительной обратной связи в системе обонятельного анализатора (преоптическая область гипоталамуса — обонятельные луковицы). Более длительная интоксикация ацетоном приводит к развитию толерантности к ингалянту. Наиболее яркой характеристикой этого состояния в нашем эксперименте явилось ослабление холинергических возбуждающих влияний в корковых структурах головного мозга, которое не снималось отменой ацетона.

Лишение животных ацетона вызывает *rebound*-реакцию, наиболее выраженную в гиппокампе, на периферии — диссоциацию процессов синтеза и высвобождения катехоламинов в кровь (повышение высвобождения дофамина, снижение адреналина). При этом наблюдается компенсаторное усиление активности периферических серо-

тонинергических процессов. Блокада рецепторов обонятельного анализатора вызывает стимуляцию симпатической нервной системы и повышение высвобождения адреналина в кровь, по-видимому, как результат развития полимодальной стресс-реакции.

Список литературы

1. Берченко О. Г., Воробьева Т. М., Бобрицкая З. М. Электрофизиологические корреляты эмоциогенных механизмов формирования влечения к летучим органическим соединениям у крыс // Украинський вісник психоневрології, 2002 (додаток). — Т.10, вип. 1 (30). — С. 248-249.
2. Гасанов Г. Г., Меликов Э. М. Нейрохимические механизмы гиппокампа, тета-ритм и поведение. — М.: Наука, 1986. — 184 с.
3. Гладышева О. С., Троицкая В. Т. Современные представления о принципах различения запахов в обонятельном органе позвоночных животных // Успехи физиологических наук. — 1985. — Т.16, № 2. — С. 98—111.
4. Дмитриева Т. Б., Игонин А. Л., Клименко Т. В. и др. Острая интоксикация психоактивными веществами (опьянение опиоидами, каннабиноидами, седативно-снотворными средствами, стимуляторами, галлюциногенами и летучими растворителями) // Наркология. — 2002. — № 7. — С. 8-12.
5. Ониани Т. Н. Интегративная функция лимбической системы. — Тбилиси: Мепниреба, 1980. — 302 с.
6. Сторожук В. М., Зинюк Л. Э. Реакции нейронов безымянной субстанции мозга кошки при инструментальном условном рефлексе // Нейрофизиология. — 1989. — Т.21, № 6. — С.796—804.
7. Хайдарлиу С. Х. Нейромедиаторные механизмы адаптации. — К.: Штиинца, 1989. — 180 с.
8. Albert A. P., Brooks P.A. Post-synaptic excitatory actions of 5-hydroxytryptamine on dorsal vagal motoneurons (DVMS) of the rat in vitro // J. Physiology Pr. — 1994. — Vol. 481. — P. 23-24.
9. Benowitz N., Hansson A., Jacob P. Cardiovascular effects of nasal and transdermal nicotine and cigarette smoking // Hypertension. — 2002. — Vol.39, № 6. — P.1107-1112.
10. Ellman G.L., Courtney K.D., Andres V.J. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity // Biochemical Pharmacology. — 1971. — № 7. — P.88—95.

11. Endo J., Ogura J. A rapid and simple determination of histamine and polyamines // J. Pharmacology. — 1975. — Vol.25. — P.610–612.
12. Funahashi S. Responses on monkey prefrontal neurons during a visual tracking task reinforced by substantia innominata self-stimulation // Brain Res. — 1983. — Vol.276, № 2. — P.267-276.
13. Lioudyno M., Verbitsky M., Holt J.C. et. al. Morphine inhibits an α -9-acetylcholine nicotinic receptor-mediated response by a mechanism which does not involve opioid receptors // Hear. Res. — 2000. — Vol.149, № 1–2. — P.167-177.
14. Marsden C. A., Sleight A. J., Fone K. C. F. Functional identification of 5HT receptor subtypes // Comp. Biochemical and Physiology. — 1989. — Vol. 93, № 1. — P. 107-114.
15. Nieuwenhuys R. Chemoarchitecture of the brain. — Berlin, Heidelberg, New-York, Tokyo: Springer-Verlag, 1985. — 246 p.
16. Persand K. S., Wood P. H., Squirell D. J. Biochemical studies of olfaction // Biochemical Soc. Trans. — 1981. — Vol.9, № 1. — P. 107–108.
17. Roth B. L., Shuang D. M. Multiple mechanisms of serotonergic signal transduction // Life Science. — 1987. — Vol.41, № 9. — P. 1051-1064.
18. Swann A. C., Johnson B. A., Cloninger C. R., Chen Y.R. Relationships of plasma tryptophan availability to course of illness and clinical features of alcoholism // Psychopharmacology. — Berlin, 1999. — Vol. 143, № 4. — P.380-384.
19. Titkova A. M. Cholinergic component of emotional reward system // Aktualus medziagu apykaitos klausimai. — Vilnius, 1994. — P. 226-227.
20. Van Kammer D. P., Mann L. S., Stenberg D. E. et. al. Dopamine α -hydroxylase activity and homovanillic acid in spinal fluid of schizophrenics with brain atrophy // Sc. — 1983. — Vol.220. — P. 974-977.

ACETYLCHOLINESTERASE ACTIVITY IN BRAIN STRUCTURES AND CONTENT OF BIOGENIC MONOAMINES IN BLOOD IN RATS UNDER LONG-TERM ACETONE VAPOR INTOXICATION

TITKOVA A.M. cand.biol.sci., leading researcher, Laboratory of neurophysiology and immunology, Institute of Neurology, Psychiatry and Narcology of AMS of Ukraine, Kharkov

KHARITONOVA S.M. researcher, Laboratory of neurophysiology and immunology, Institute of Neurology, Psychiatry and Narcology of AMS of Ukraine, Kharkov

The study has been carried out on the model of acetone vapor intoxication in rats in two modes (5 min during 13 days and 10 min during 17 days). Application of acetone withdrawal and peripheral olfactory receptors blockade allowed to reveal the characteristic features of central cholinergic regulation in development of states of tolerance and dependence on inhalant. There has been shown a participation of peripheral hormonal and mediator mechanisms of adaptation in stabilization of the acquired pathological alterations.