

УДК 613.81:612.396.2:616.153.281]:599.323.45

А.К. Бортникова

ВЛИЯНИЕ КОРРЕКЦИИ УРОВНЯ КЕТОНЕМИИ И ГЛИКЕМИИ НА ВЛЕЧЕНИЕ К ЭТАНОЛУ У КРЫС СО СФОРМИРОВАННОЙ АЛКОГОЛЬНОЙ ЗАВИСИМОСТЬЮ

Донецкий национальный медицинский университет им. М. Горького

Реферат. В условиях гипогликемии мозг алкоголь-зависимых животных утилизирует кетоновые тела. Этанол провоцирует синтез кетоновых тел. Формируется порочный круг: потребление этанола → гипогликемия → образование кетонов → питание мозга кетонами → потребность мозга в кетонах → потребность организма в этаноле. На алкогользависимых крысах с выраженной гипогликемией и кетозом показано, что искусственное подавление кетоза не уменьшает влечение к этанолу. Напротив, продолжительная коррекция уровня гликемии способствует снижению потребления алкоголя и исчезновению кетоза. Делается вывод, что суть влечения к алкоголю состоит в зависимости не от этанола непосредственно, а от кетоновых тел, образование которых иницируется гипогликемией.

Ключевые слова: алкогольная зависимость, гипогликемия, кетоз, метаболическая коррекция, крысы.

Введение. Это исследование посвящено изучению этиологии патологического влечения к алкоголю. Составляя модель эксперимента, мы руководствовались общебиологическим принципом, что поведенческая реакция влечения к чему бы то ни было является отражением внутреннего состояния организма. Поскольку в основе алкогольной болезни лежат метаболические нарушения (гипогликемия и кетоацидоз), то и в нашем исследовании контролируемые параметрами стали уровень гликемии и уровень кетонурии, а главной исследуемой производной — количество выпитого этанола в условиях свободного выбора. Ввиду длительной гипогликемии клетки алкогольизированного организма претерпевают глубокие перестройки ферментативных систем и переходят на питание кетоновыми телами, которые становятся главными топливными молекулами [1]. Образование кетоновых тел стимулируется этанолом. Точно так же, как здоровый организм зависит от главного питательного субстрата — глюкозы, так и алкогольизированный организм зависит от главного альтернативного энергетического субстрата в условиях гипогликемии — кетоновых тел. В здоровом организме при снижении концентрации глюкозы в крови возникает чувство голода, а в алкогольизированном организме при снижении уровня кетоновых тел в крови возникает чувство тоже своего рода голода. Но поскольку образование кетоновых тел стимулируется большими дозами этано-

ла, то отличительной особенностью голода алкоголика является влечение не к традиционной пище (как поставщику глюкозы), а к алкоголю (как поставщику кетоновых тел). Алкоголизированные животные отказываются от глюкозы, несмотря на выраженную гипогликемию. При предоставлении свободного выбора между этанолом с добавлением хинина и водой, подслащенной сахаром, животные выбирали этанол с хинином [4]. Мы предположили, что алкогользависимые животные отказываются от предлагаемой глюкозы потому, что не нуждаются в ней, поскольку клетки мозга перешли на питание другим субстратом — кетоновыми телами. А поскольку образование кетоновых тел в печени иницируется этанолом, то формируется порочный круг: употребление этанола → гипогликемия → образование кетонов → питание мозга кетонами → потребность мозга в кетонах → потребность организма в этаноле. Иными словами, парадокс заключается в том, что алкогольная зависимость — зависимость не от алкоголя, а непосредственно от кетонов вследствие перестройки ферментативных систем головного мозга на питание альтернативным субстратом.

Чтобы проверить нашу рабочую гипотезу, мы провели эксперимент, целью которого было проследить влияние метаболической коррекции уровня гликемии и кетонемии на влечение к алкоголю.

В наркологической клинике для устранения кетоза (и связанных с ним тошноты, рвоты) больным вводят фармакологические препараты, нейтрализующие кетоновые тела [Колмакова Т.С.]. Действующее вещество этих препаратов из группы антидотов — димеркаптопропансульфонат натрия, или унитиол — донатор сульфгидрильных (тиоловых) групп. С помощью двух активных сульфгидрильных групп он связывается с кислородом С=О групп кетоновых тел прямо в периферической крови, превращая их в нетоксичные соединения [2]. Это лечебное мероприятие всегда проводят на фоне внутривенного введения глюкозы [1].

Материалы и методы. Эксперимент выполнен на 40 самцах лабораторных крыс линии Вистар, возраста 12 месяцев, массой

200–250 г. в осенне-зимний период в условиях вивария с принудительной вентиляцией. Были соблюдены принципы Хельсинской декларации о гуманном отношении к животным. Температура в виварии поддерживалась на уровне 18–22 °С, что исключало избыточную жажду. Доступ к пище был свободен. Пища сбалансирована, что позволяло сохранять питьевое поведение на постоянном уровне. В течение 16 недель крысы подвергались принудительной алкоголизации 10 % этанолом.

После окончания принудительной алкоголизации у животных был свободный выбор между водой и 10% этанолом. При этом крыс разделили на три экспериментальные группы и три контрольные. Крысам первой группы ($n = 10$) с целью устранения кетоза в течение 30 дней ежедневно 3 раза в день с интервалом 5 часов *per os* при помощи шприца с затупленной иглой большого диаметра вводили 1,4 % раствора унитиола (препарат Зорекс «Валента фармацевтика», Россия), из расчёта 3,5 мг/кг. Объем введения составлял 0,8–1,2 мл, в зависимости от веса животного. Животным второй группы ($n = 10$) с целью устранения гипогликемии вводили *per os* 1 мл заваренного киселя из 40 % крахмала (в перерасчете на глюкозу — это 2,0 г/кг веса животного). Выбор крахмала обусловлен тем, что этот сложный полисахарид с разветвленной цепью в желудочно-кишечном тракте крыс расщепляется довольно долго. Образующаяся глюкоза всасывается постепенно, что обеспечивает поддержание стабильного уровня глюкозы в крови в течение длительного времени и не провоцирует перенапряжения инсулярного аппарата поджелудочной железы. Фактически пероральное введение густого киселя из крахмала можно приравнять к усиленному углеводному питанию. Животным третьей группы ($n = 10$) с целью устранения кетоза и гипогликемии вводили 0,5 мл 80 % крахмала и 0,4–0,6 мл 2,8 % раствора унитиола. Животным четвертой, контрольной, группы алкоголизованных животных ($n = 10$) метаболическая коррекция не проводилась, им 3 раза в день вводили 1 мл 0,9 % хлорида натрия. Регистрировали количество выпитого этанола и воды. Поскольку животные различались между собой в весе, делали пересчёт объёма выпитого спирта в миллилитрах на 100 граммов массы тела крысы.

Для контроля влияния данных методов коррекции на состояние здоровых животных были набраны еще 4 группы крыс без предварительной алкоголизации (5-я — 8-я группы). Животным 5-й группы ($n = 10$), 3 раза в день вводили *per os* 1,4 % раствора унитиола, 6-й ($n = 10$) — 1 мл заваренного киселя из 40 % крахмала, 7-й ($n = 10$) — 0,5 мл 80 % крахмала и 0,4–0,6 мл 2,8 % раствора унитиола, 8-й ($n = 10$) — 1 мл 0,9 % хло-

рида натрия, соответственно, как и в экспериментальных группах.

На 10-й, 20-й и 30-й день эксперимента мониторировали содержание глюкозы в крови и кетоновых тел в моче, уровень потребления алкоголя, воды и раствора 5% глюкозы в условиях свободного выбора. Забор биологических жидкостей проводили с утра, до перорального введения. Забор 0,5 мл крови производили из хвостовой вены. Сбор мочи производили, высаживая крысу в пластиковый контейнер с перфорированным дном. Моча стекала в поддон. Использовали тест-полоски *Citolab* (Фармаско, Украина). На бумагу тест-полосок нанесен нитропруссид натрия, при взаимодействии с которым кетоновые тела дают красно-фиолетовое окрашивание. Интенсивность окрашивания меняется в зависимости от концентрации кетоновых тел.

При обработке данных использовали пакет *MedStat* [3]. Так как распределение значений выпитой жидкости не отличалось от нормального, то были применены параметрические методы статистического анализа.

Качественным показателям уровня кетонов в моче были присвоены категории от 0 до 5, в зависимости от степени выраженности кетонурии, и так как эти данные не подлежат нормальному распределению, для их анализа были использованы непараметрические методы статистического анализа: сравнение центров связанных выборок с использованием двустороннего критерия, Т-критерия Вилкоксона, проводился ранговый однофакторный дисперсионный анализ Крускала — Уоллиса, в случаях выявления статистически значимых различий между группами проводилось попарное сравнение с использованием критерия Данна.

В ходе дисперсионного анализа были проведены множественные сравнения для определения различий средних в несвязанных группах по количественным признакам, отвечающим нормальному распределению (потребление этанола и уровень глюкозы крови); также проводили сравнения средних по каждой группе в разные периоды эксперимента.

Результаты и обсуждение. Кетоновых тел в моче здоровых животных до начала принудительной алкоголизации не обнаружено. Уровень глюкозы в крови крыс до начала алкоголизации составил $7,0 \pm 0,2$ ммоль/л, т.е. значение этой константы у крыс несколько выше по сравнению с таковой у человека ($3,3–5,5$ ммоль/л).

До начала принудительной алкоголизации крысы ежедневно выпивали воды по $2,3 \pm 0,1$ мл/100 г веса и глюкозы по $1,5 \pm 0,2$ мл/100 г веса. В первую неделю животные выпивали этанола по $3,3 \pm 0,7$ мл/100 г веса. К концу третьей недели алкоголизации количество

Таблица 1. Влияние принудительного введения унитиола и глюкозы на содержание глюкозы в крови и на количество потребляемого этанола, в условиях свободного выбора

Группа	Вещество, вводимое пер ос	Длительность введения пер ос, декады	Потребление 10 % этанола, $X_3 \pm \sigma$, мл на 100г	Уровень глюкозы крови, $X_7 \pm \sigma$, ммоль/л
1-я алкоголизованные n = 10	Унитиол	Одна	5,1 ± 1,1	3,6 ± 0,8
		Две	4,3 ± 0,9 [#]	3,8 ± 0,9
		Три	5,1 ± 1,0 [#]	4,0 ± 0,8
2-я алкоголизованные n = 10	Крахмал	Одна	4,4 ± 1,1*	6,0 ± 1,4*
		Две	3,0 ± 1,2* [#]	6,1 ± 1,8*
		Три	2,6 ± 1,0* [#]	7,1 ± 1,2* [#]
3-я алкоголизованные n = 10	Унитиол + крахмал	Одна	5,2 ± 1,1	6,0 ± 1,2*
		Две	3,1 ± 1,3* [#]	6,0 ± 1,4*
		Три	3,5 ± 1,5*	7,1 ± 1,1* [#]
4-я алкоголизованные n = 10	Хлорид натрия	Одна	5,5 ± 0,9	3,0 ± 0,7
		Две	4,5 ± 1,0 [#]	3,2 ± 0,7
		Три	4,5 ± 1,1	3,5 ± 0,8
5-я здоровые n = 10	Унитиол	Одна	0	7,1 ± 0,9
		Две	0	6,9 ± 0,6
		Три	0	7,0 ± 0,5
6-я здоровые n = 10	Крахмал	Одна	0	6,8 ± 1,2
		Две	0	7,5 ± 0,6 [#]
		Три	0	7,4 ± 0,6
7-я здоровые n = 10	Унитиол + крахмал	Одна	0	7,0 ± 1,0
		Две	0	7,5 ± 0,6 [#]
		Три	0	7,4 ± 0,6
8-я здоровые n = 10	Хлорид натрия	Одна	0	6,9 ± 0,4
		Две	0	6,7 ± 0,5
		Три	0	6,7 ± 0,7

Определяются статистически значимые отличия, $p < 0,005$:

* — по сравнению с показателями 4-й группы алкоголизованных животных без метаболической коррекции (алкоголь+0,9 % NaCl) в тот же временной период;

— внутри одной группы, по сравнению с предыдущим контрольным периодом;

потребляемого этанола возросло в среднем до $4,9 \pm 1,1$ мл/100 г веса. К концу шестой недели потребление этанола достигло максимума: $6,4 \pm 1,4$ мл/100 г веса. Количества потребляемого алкоголя в указанные периоды отличались на уровне значимости $p < 0,001$. Критерием сформированной алкогольной зависимости являлся факт предпочтения этанола перед другими видами жидкости, в однодневных экспериментах, в условиях свободного выбора. В ходе 16-недельной алкоголизации, и по ее окончании регистрировалась стабильная гипогликемия, $3,0 \pm 0,3$ ммоль/л.

После окончания алкоголизации наблюдали животных ещё 30 дней (табл. 1–2).

У контрольных здоровых животных (5–8 группы) кетонурии не определялось ни до, ни после 30-дневного эксперимента. Принудительная алкоголизация сопровождалась кетонурией у всех 100 % крыс, но с разной степенью выраженности: у 2 крыс (5%) — до 0,5 ммоль/л; у 6 крыс (15 %) — 0,6–1,5 ммоль/л; у 24 крыс (60 %) — 1,6–3,9 ммоль/л; у 8 крыс (20 %) — 1,7–10 ммоль/л. Введение унитиола

и глюкозы по разному повлияло на выраженность кетоза. Уровень кетонурии представлен в таблице 2 в виде процентного соотношения показателей.

Анализ данных, приведенных в таблицах 1 и 2, позволяет сделать ряд заключений. Некоторые из них перекрестные:

- потребление больших количеств этанола на фоне проводимой коррекции сопровождается сохранением выраженного кетоза (1-я и 4-я группы);

- искусственное устранение кетоза унитиолом имеет кратковременный эффект; кетоз возобновляется и сохраняется всё время, пока животные потребляют большое количество алкоголя (1-я группа);

- систематическое введение унитиола (1-я группа) уменьшает проявления кетоза по сравнению с контрольной группой алкоголизованных животных (4-я группа),

- искусственное подавление кетоза унитиолом (1-я группа) хоть и несколько снизило потребление этанола, однако данная динамика снижения ничем не отличалась как и

Таблица 2. Влияние введения зорекса и глюкозы на содержание кетоновых тел в моче

Группа	Вещество, вводимое per os	Длительность введения per os, недель	Количество крыс с данной степенью кетонурии, %				
			Нет кетонов (-)	до 0,5 ммоль/л (±)	0,6–1,5 ммоль/л (+)	1,6–3,9 ммоль/л (++)	1,7–10 ммоль/л (+++)
1-я n = 10	Унитиол	Одна	10 %	60 %	30 %	0 %	0 %
		Две	20 %	70 %	10 %	0 %	0 %
		Три	20 %	60 %	20 %	0 %	0 %
2-я n = 10	Глюкоза	Одна	50 %	40 %	10 %	0 %	0 %
		Две	70 %	30 %	0 %	0 %	0 %
		Три	80 %	20 %	0 %	0 %	0 %
3-я n = 10	Унитиол + глюкоза	Одна	50 %	30 %	10 %	10 %	0 %
		Две	70 %	30 %	0 %	0 %	0 %
		Три	70 %	30 %	0 %	0 %	0 %
4-я n = 10	Хлорид натрия	Одна	0 %	10 %	70 %	20 %	0 %
		Две	0 %	20 %	70 %	10 %	0 %
		Три	10 %	80 %	10 %	0 %	0 %

при отсутствии метаболической коррекции (4-я группа),

- подавление кетоза не способствует уменьшению гипогликемии (1-я группа);

- уменьшению кетонурии в большей мере способствует не введение унитиола (1-я группа), а устранение гипогликемии (2-я и 3-я группы);

- устранение гипогликемии способствует не только устранению кетоза, но и снижению влечения к этанолу (2-я и 3-я группы);

- ослабление пристрастия к этанолу происходит не за счёт устранения кетоза (1-я группа), а за счёт устранения гипогликемии (2-я и 3-я группы);

- длительная, 30-дневная, принудительная углеводная коррекция способствует нормализации уровня гликемии (2-я и 3-я группы);

- у алкогользависимых крыс без метаболической коррекции кетоза и гликемии, в условиях свободного выбора, сохраняется высокий уровень потребления алкоголя, выраженная кетонурия, гипогликемия (4-я группа).

- 30-дневное введение унитиола у здоровых животных (5-я группа) не влияет на уровень гликемии, кетонурии и потребление алкоголя.

- 30-дневная углеводная коррекция у здоровых животных (6-я и 7-я группы) приводит к повышению уровня гликемии, но в пределах показателей нормогликемии для крыс

Относительно восстановления трех контролируемых нами параметров — уровня гликемии, кетонурии и потребления этанола, углеводная коррекция оказалась наиболее эффективной, а коррекция унитиолом — наименее эффективной.

Анализируя результаты этой экспериментальной работы, мы можем предположить, что снижению пристрастия к алкоголю может способствовать такая метаболическая коррекция, которая бы восстанавливала чувствительность клеток мозга к глюкозе,

способствовала бы повышению утилизации глюкозы мозгом. Очевидно, что такое возможно при восстановлении должной активности ферментов гликолиза. Это бы помогло мозгу в меньшей степени утилизировать кетоны в качестве питательного субстрата, а в перспективе — облегчило бы отказ от алкоголя. Для этого необходимо устранить хроническую гипогликемию. Согласно нашим данным, очень важно, чтобы такая коррекция не была краткой. Но в настоящее время в клинической практике внутривенное введение глюкозы для коррекции углеводного метаболизма используют ровно столько, сколько больной находится на лечении в стационаре, т.е. непродолжительно, всего несколько дней [1]. Возможно, это слишком короткий период, и нейроны не успевают восстановить углеводный метаболизм, т.е. перейти с питания кетонами на питание глюкозой. Необходимо также учитывать, что больным алкоголизмом присущи анорексия, агедония. Поэтому одной из мер после выписки из стационара должно быть обязательное обеспечение добротным, возможно даже избыточным, питанием. Исходя из того, что три недели жизни крысы условно приравниваются к 2–2,5 годам человеческой жизни, желательнее, чтобы жёсткий контроль за питанием таких больных продолжался не менее трёх лет.

Зафиксированный нами факт, что длительное введение унитиола крысам не уменьшало потребления алкоголя, свидетельствует, на наш взгляд, о том, что искусственное устранение кетоза, лишая мозг питательного субстрата, лишь провоцирует организм на стабилизацию потребления алкоголя, который является мощным стимулятором процесса кетообразования. Иными словами, введение унитиола в долгосрочной перспективе не просто не может устранить причину

влечения к алкоголю, но и является вредным. Положительный же эффект его введения при острых состояниях обусловлен только лишь быстрым устранением выраженного кетоацидоза и острого токсического действия кетонов на мозг, и как следствие, устранения неприятных субъективных ощущений (тошноты, рвоты, неприятного запаха перегара). Подтверждением сделанного вывода является и то, что несмотря на длительное введение унитиола, концентрация кетоновых тел в моче (а значит, и в крови) не снижалась до показателей здоровых животных, оставаясь на стабильном уровне (до 0,5 ммоль/л).

Выводы. На стадии сформированной алкогольной зависимости причиной влечения к алкоголю является потребность мозга в кетоновых телах, возникающая как результат хронической гипогликемии.

Искусственное подавление кетоза не уменьшает влечение к этанолу.

Продолжительная коррекция гипогликемии способствует уменьшению потребления алкоголя, восстановлению нормогликемии, снижению кетонурии.

A.K. Bortnikova

INFLUENCE OF CORRECTION KETONEMIA AND GLYCEMIA LEVEL ON THE ATTRACTION TO ETHANOL IN RATS WITH FORMING ALCOHOL ADDICTION

Abstract. *In view of a hypoglycemia the brain of alcohol-dependent animals utilizes ketonic bodies. Ethanol provokes*

formation of ketonic bodies. So called "wrong circle" became isolated: the ethanol using → hypoglycemia → formation of ketones → a brain food by ketones → the brain needs for ketones → an organism needs of ethanol. On alcoholreliant rats with the expressed hypoglycemia and ketosis it is shown that artificial suppression ketosis doesn't reduce an attraction to ethanol. On the contrary, the long metabolic correction level of glycemia, promotes weakening of a consumption of alcohol and disappearance ketosis. The conclusion is drawn that the necessitate essence to alcohol consists in dependence not from ethanol directly, and from the ketonic bodies which education is initiated by a hypoglycemia.

Keywords: *alcohol addiction, hypoglycemia, ketosis, the metabolic correction, rats.*

ЛИТЕРАТУРА

1. Колмакова Т.С. Современное представление об эпигенетических механизмах формирования наркозависимости и психических расстройств эмоциональной сферы / Т.С. Колмакова, Н.А. Григорян // *Фундаментальные исследования.* – 2012. – № 10 (часть 2). – С. 380-385.
2. Машковский М. Д. *Лекарственные средства.* 15-е изд., перераб., испр. и доп. – М.: ООО «Издательство Новая Волна», 2005. – 1206 с.
3. *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.
4. Vendruscolo L.F., Barbier E., Schlosburg J.E. Corticosteroid-dependent plasticity mediates compulsive alcohol drinking in rats. – *J. Neurosci.* – 2012. – Vol. 32, No. 22. – P. 7563-7571.