

ВЛИЯНИЕ ГЛИЦИЛ-L-ГЛУТАМИНА И ЕГО ЗАЩИЩЕННОГО ПРОИЗВОДНОГО НА ПРЕДПОЧТЕНИЕ ЭТАНОЛА У КРЫС В УСЛОВИЯХ СВОБОДНОГО ВЫБОРА

Шляхтун А.Г.¹, Бубен А.Л.², Самойлик А.А.¹, Пронько П.С.¹

1 – ГП «Институт биохимии биологически активных соединений НАН Беларуси»,

2 – УО «Гродненский государственный медицинский университет»

Введение. Алкогольная зависимость - хроническое релапсирующее расстройство с наследственной предрасположенностью, характеризующееся доминантой поиска и получения алкоголя, потерей контроля его потребления, развитием толерантности, зависимости и нарушением социальной деятельности. Считается, что до 10% населения индустриально развитых стран страдает алкогольной зависимостью.

Лечение алкогольной зависимости предполагает медицинские, психологические и социальные вмешательства, направленные на устранение стремления к употреблению алкоголя и на уменьшение причиняемого им вреда.

Ввиду отсутствия эффективных лекарственных средств против алкоголизма остается актуальным поиск новых препаратов для терапии алкогольной зависимости.

Ранее нами показано, что глутамин и его дипептиды – аланил-L-глутамин и глицил-L-глутамин при внутрибрюшинном введении в дозе 1 ммоль/кг обладают способностью значительно снижать уровень предпочтения этанола у крыс в условиях свободного выбора [1]. Особенно в этом отношении интересен глицил-L-глутамин, который является продуктом распада β-эндорфина (фрагмент 30-31). Так было показано, что при введении глицил-L-глутамина в дозах до 100 пмоль внутрь некоторых ядер лимбической системы мозга линейных крыс с высоким уровнем предпочтения этанола происходит снижение потребления этанола в условиях «2-х бутылочного теста» [2].

Цель настоящего исследования заключалась в оценке влияния глицил-L-глутамина и его нового защищенного производного на предпочтение этанола крысами в условиях свободного выбора и выяснении возможных механизмов действия соединений.

Материалы и методы. Для первой части эксперимента отобрано 60 крыс-самцов линии Wistar Wescott 200-220 г. Животные содержались в помещении при контролируемом температурном режиме ($21 \pm 2^\circ\text{C}$). На протяжении всего эксперимента животные получали пищу *ad libitum*. Формирование алкогольной зависимости проводили по ранее описанному методу на протяжении 45 сут [1]. Для эксперимента использовали животных с уровнем потребления этанола более 5 г/кг/сут. Из отобранных 24 животных путем рандомизации сформированы 4 группы, не отличавшиеся по весу и коэффициенту предпочтения этанола. Для оценки индивидуального потребления алкоголя животных размещали в индивидуальные клетки на 10 сут и предлагали выбор между двумя сосудах с 10% (в/о) раствором этанола или водой, содержащими подсластитель «Сусли» в количестве 2 г/л жидкости для маскировки неприятного вкуса этанола. Для предотвращения выработки реакции на определенное положение бутылки, поилки с водой и алкоголем меняли местами ежедневно. Животным на протяжении последних 5 суток эксперимента, через каждые 24 часа, после оценки потребления жидкостей, вводили внутрибрюшинно глутамин и глицилглутамин в дозах 1 ммоль/кг массы тела, препарат RGQN1 – в дозе 1 мг/кг. Контрольные животные получали эквивалентное количество физиологического раствора.

Отношение объема потребленного раствора этанола к общему объему выпитой жидкости, в процентах, использовался как коэффициент предпочтения этанола (КП). Высчитывалось усредненное значение коэффициента предпочтения для каждого животного за 5 сут.

После 5 сут введения препаратов и оценки потребления этанола животные были эвтаназированы. После декапитации мозг быстро извлекали, выделяли отделы мозга (большие полушария, гипоталамус, ствол), которые замораживали в жидком азоте и хранили

до исследования. Выделение отделов мозга осуществляли на льду. Время от забоя животных до погружения образцов тканей в жидкий азот составляло не более 2 мин.

Использованные в работе реактивы и препараты были марки не ниже «хч». Использованные для ВЭЖХ элюенты имели квалификацию "для жидкостной хроматографии". Препарат RGQN1, представляющий собой защищенный глицил-L-глутамин, синтезировали из предварительно модифицированных аминокислот карбодиимидным методом и подвергали дополнительной очистке колоночной хроматографией. Чистоту препарата проверяли хроматографически (>95%). Для алкоголизации животных использовали спирт-ректификат марки «Люкс».

Определение уровней свободных аминокислот и биогенных аминов проводили в хлорнокислых экстрактах тканей обращенно-фазной ВЭЖХ на хроматографической системе Agilent 1200 со спектрофотометрическим диодно-матричным и флуоресцентным детекторами. Прием и обработка хроматограмм осуществлялась с помощью модуля обработки данных Agilent ChemStation v. B03.04.

При работе с животными соблюдались этические нормы, установленные Хельсинкской Декларацией по гуманному обращению с животными, а также иные нормативные акты, принятые в практике биомедицинских исследований.

Статистическую обработку результатов исследования проводили с использованием пакета статистических программ GraphPad Prism v. 5. Данные представлены в виде $M \pm m$, где M — среднее, m — стандартная ошибка среднего. Для выявления достоверности изменений в потреблении этанола в группах до и после введения препаратов использовали парный t -критерий Стьюдента. Для выявления значимости отличий в содержании нейромедиаторов в отделах мозга между группами использовали ANOVA с последующим тестом Даннета. Статистически значимыми считали различия при значении $p < 0,05$.

Результаты исследований. Полученные данные показали, что глицилглутамин RGQN1 в выбранной дозе статистически значимо снижал потребление и коэффициент предпочтения этанола у крыс в среднем на 40-45%, по сравнению с уровнями потребления и предпочтения этанола до введения препарата. Глутамин в выбранной дозе (1 ммоль/кг) лишь незначительно снижал потребление и предпочтение этанола животными в условиях эксперимента (Табл. 1).

Таблица 1. Потребление этанола и коэффициенты предпочтения этанола (%) крысами до и после 5 суток введения глутамина, глицилглутамина в дозах 1 ммоль/кг и RGQN1 в дозе 1 мг/кг

Группа	До введения препаратов		После введения препаратов	
	Потребление этанола, г/кг/сут	КП, %	Потребление этанола, г/кг/сут	КП, %
Контроль (n=6)	5,76±0,40	64,15±2,37	5,59±0,55	67,12±5,66
Глутамин (n=6)	5,85±0,68	65,16±7,51	5,12±0,30	61,12±2,60
Глицилглутамин (n=6)	6,45±1,29	74,63±8,59	3,66±0,32 ^a	42,41±3,67 ^a
RGQN1 (n=6)	6,65±0,59	74,60±5,12	3,86±0,28 ^a	46,41±2,87 ^a

Примечание: а – $p < 0,05$ по сравнению со значением до введения препаратов

При исследовании нейромедиаторных систем алкоголизированных животных наиболее выраженные сдвиги при алкоголизации отмечены в гипоталамусе, несколько менее выраженные – в стволе мозга. В гипоталамусе крыс контрольной группы наблюдался сдвиг в соотношении тормозных и возбуждающих аминокислот, в содержании некоторых метаболитов дофаминовой и серотониновой систем. Внутрибрюшинное введение глицил-L-

глутамин (1 ммоль/кг) и RGQN1 (1 мг/кг) крысам с высоким индексом предпочтения этанола сопровождалось нормализацией содержания уровней как аминокислот, так и биогенных аминов и их метаболитов (Табл. 2).

Таблица 2. Содержание некоторых аминокислот, биогенных аминов и их метаболитов в гипоталамусе крыс при хронической алкогольной интоксикации и отмене этанола, ммоль/г ткани (n=6)

Вещество	Группа				
	Интактный контроль	Контроль	Глутамин	Глицил-L-глутамин	RGQN1
Asp	6265±152	7534±197 ^a	6395±162	6311±42 ^b	6274±81 ^b
Glu	22395±214	25292±212 ^a	23541±482 ^{ab}	22743±192 ^b	23280±219 ^b
GABA	10260±105	8872±103 ^a	10013±103 ^b	10020±65 ^b	10267±178 ^b
DA	1,953±0,022	2,446±0,015 ^a	2,200±0,013 ^a	2,036±0,107 ^b	2,063±0,015 ^b
5-HIAA	5,362±0,137	6,373±0,152 ^a	5,868±0,038	5,622±0,033 ^b	5,697±0,033 ^b
Trp	16,998±0,120	18,974±0,132 ^a	17,986±0,124 ^a	17,832±0,03 ^{ab}	17,837±0,10 ^{ab}
HVA	0,185±0,011	0,153±0,011 ^a	0,169±0,011	0,195±0,011 ^b	0,195±0,011 ^b
5-НТ	3,608±0,120	4,446±0,13 ^a	4,027±0,019	3,770±0,023 ^b	3,751±0,020 ^b

Примечание: *a* – $p < 0.05$ по сравнению с интактными животными; *b* – $p < 0.05$ по сравнению с животными контрольной группы

Таким образом, установлено, что глицил-L-глутамин и его новое производное RGQN1, в дозах 1 ммоль/кг и 1 мг/кг, соответственно, снижают уровни потребления и предпочтения этанола крысами в условиях свободного выбора. Обнаруженные свойства соединений, вероятно, обусловлены нормализующим действием соединений на уровни нейромедиаторов и их обмен в отделах головного мозга крыс. В перспективе, на основе глицил-L-глутамин, его производного - RGQN1 или других структурных аналогов возможно создание лекарственного средства для терапии алкогольной зависимости.

Литература

1. Shlyahtun, A.H. Effect of glutamine-containing dipeptides on the level of voluntary ethanol consumption in rats / Shlyahtun A.H., P.S. Pronko // Alcohol and Alcoholism. – 2011. – Vol. 46, Suppl. 1. – P. 44.
2. Resch, G.E. Glycyl-glutamine reduces ethanol intake at three reward sites in P rats / G.E. Resch, C.W. Simpson // Alcohol. – 2008. – Vol. 42, No. 2. – P. 99–106.

EFFECT OF GLYCYL-L-GLUTAMINE AND ITS PROTECTED ANALOG ON A VOLUNTARY ETHANOL CONSUMPTION IN RATS

Shlyahtun A.H.¹, Buben A.L.², Samoylik A.A.¹, Pronko P.S.¹

¹ – Institute of biologically active substances of National Academy of Sciences of Belarus;

² – Grodno state medical university

The effects of glycyl-L-glutamine and its protected analog, on ethanol consumption and preference and the brain neurotransmitter levels were studied in two-bottle choicetestin rats. The study demonstrated that glycyl-L-glutamine and its synthetic analogs significantly decreased ethanol consumption in two-bottle choicetest in rats, possibly because these substances restored the levels of some neurotransmitters to normal values. Glycyl-L-glutamine, its derivative RGQN1 or other structural analogs potentially can be used in the treatment of alcohol dependence.