


МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ ДОНЕЦКОЙ НАРОДНОЙ РЕСПУБЛИКИ
ГОСУДАРСТВЕННАЯ ОБРАЗОВАТЕЛЬНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ ВЫСШЕГО
ПРОФЕССИОНАЛЬНОГО ОБРАЗОВАНИЯ «ДОНЕЦКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ
МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ М. ГОРЬКОГО»

На правах рукописи



БОРТНИКОВА АННА КОНСТАНТИНОВНА

УДК 616.831-008.9-092+613.81

**ПАТОФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ НАРУШЕНИЙ
ПРОМЕЖУТОЧНОГО УГЛЕВОДНОГО ОБМЕНА ГОЛОВНОГО МОЗГА
ПРИ ФОРМИРОВАНИИ СТОЙКОГО ВЛЕЧЕНИЯ К ЭТАНОЛУ
(экспериментальное исследование)**

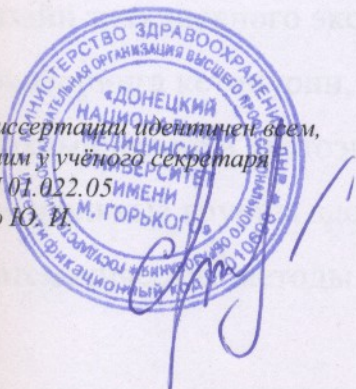
14.03.03 – патологическая физиология

ДИСЕРТАЦИЯ

на соискание учёной степени
кандидата медицинских наук

Начный руководитель -
доктор медицинских наук, профессор
Бондаренко Надежда Николаевна

Экземпляр диссертации идентичен всем,
существующим у учёного секретаря
Диссовета Д 07.022.05
Стрельченко Ю. И.



Донецк – 2021

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ ДОНЕЦКОЙ НАРОДНОЙ РЕСПУБЛИКИ
ГОСУДАРСТВЕННАЯ ОБРАЗОВАТЕЛЬНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ ВЫСШЕГО
ПРОФЕССИОНАЛЬНОГО ОБРАЗОВАНИЯ «ДОНЕЦКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ
МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ М. ГОРЬКОГО»

На правах рукописи

БОРТНИКОВА АННА КОНСТАНТИНОВНА

УДК 616.831-008.9-092+613.81

**ПАТОФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ НАРУШЕНИЙ
ПРОМЕЖУТОЧНОГО УГЛЕВОДНОГО ОБМЕНА ГОЛОВНОГО МОЗГА
ПРИ ФОРМИРОВАНИИ СТОЙКОГО ВЛЕЧЕНИЯ К ЭТАНОЛУ
(экспериментальное исследование)**

14.03.03 – патологическая физиология

ДИСЕРТАЦИЯ

на соискание учёной степени
кандидата медицинских наук

Начный руководитель -
доктор медицинских наук, профессор
Бондаренко Надежда Николаевна

*Экземпляр диссертации идентичен всем,
существующим у учёного секретаря
Диссовета Д 01.022.05
Стрельченко Ю. И.*

Донецк – 2021

ОГЛАВЛЕНИЕ

| | Стр |
|--|-----|
| ВВЕДЕНИЕ | 5 |
| ГЛАВА 1. НАРУШЕНИЯ УГЛЕВОДНОГО-ЭНЕРГЕТИЧЕСКОГО БАЛАНСА МОЗГА ПРИ АЛКОГОЛЬНОЙ БОЛЕЗНИ (обзор литературы) | 13 |
| 1.1. Метаболизм этанола в организме..... | 14 |
| 1.2. Повреждающее влияние этанола на мозг..... | 16 |
| 1.3. Влияние метаболитов этанола на головной мозг..... | 19 |
| 1.4. Нарушение углеводного обмена при алкоголизме..... | 21 |
| 1.5. Причина алкогольной кетонемии..... | 23 |
| 1.6. Изменение кислотно-щелочного равновесия при алкоголизме..... | 26 |
| 1.7. Алкогольиндуцированный окислительный и воспалительный стресс. | 27 |
| 1.8. Влияние на мозг гипогликемии..... | 30 |
| 1.9. Природа изменений внутриклеточного метаболизма при алкоголизации..... | 33 |
| ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ | 38 |
| 2.1. Условия содержания животных..... | 39 |
| 2.2. Дизайн эксперимента..... | 39 |
| 2.3. Моделирование принудительной алкоголизации..... | 41 |
| 2.4. Виды метаболической коррекции, выполняемой на II этапе эксперимента..... | 44 |
| 2.5. Исследование артериовенозной разницы по глюкозе..... | 45 |
| 2.6. Дизайн трехдневного эксперимента для суточного почасового мониторинга кетонурии, гликемии, влечения к алкоголю..... | 46 |
| 2.7. Биохимические и гистоэнзимологические методы..... | 48 |
| 2.8. Контрольные группы здоровых крыс..... | 50 |
| 2.9. Математические методы статистического анализа..... | 50 |
| ГЛАВА 3. ОЦЕНКА ВЛИЯНИЯ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ | |

| | |
|--|------------|
| ПРИНУДИТЕЛЬНОЙ АЛКОГОЛИЗАЦИИ НА ФОРМИРОВАНИЕ ВЛЕЧЕНИЯ К ЭТАНОЛУ, УРОВЕНЬ ГЛИКЕМИИ, КЕТОНУРИИ И ГЕДОНИИ У КРЫС..... | 52 |
| 3.1 Изменение уровня гликемии в процессе принудительной алкоголизации..... | 53 |
| 3.2 Изменение уровня гедонии и потребления воды в процессе принудительной алкоголизации..... | 54 |
| 3.3 Динамика формирования влечения к алкоголю в процессе принудительной алкоголизации..... | 57 |
| 3.4 Динамика формирования кетонурии в процессе принудительной алкоголизации..... | 60 |
| 3.5 Изменение способности тканей мозга утилизировать глюкозу в результате принудительной алкоголизации..... | 63 |
| 3.6 Изменение активности ферментов гликолиза и энергетического обмена в различных зонах головного мозга в результате принудительной алкоголизации..... | 67 |
| ГЛАВА 4. ВЛИЯНИЕ ДЛИТЕЛЬНОЙ МЕТАБОЛИЧЕСКОЙ КОРРЕКЦИИ НА ПАРАМЕТРЫ УГЛЕВОДНОГО ГОМЕОСТАЗА И ВЛЕЧЕНИЕ К ЭТАНОЛУ У АЛКОГОЛЬЗАВИСИМЫХ КРЫС..... | 71 |
| 4.1. Динамика изменений параметров углеводного гомеостаза, питьевого режима и влечения к этанолу при метаболической коррекции..... | 72 |
| 4.2. Изменение способность головного мозга и организма в целом утилизировать глюкозу при метаболической коррекции гликемии..... | 85 |
| 4.3. Изменение мощности углеводного и энергетического обмена в клетках головного мозга при метаболической коррекции..... | 91 |
| ГЛАВА 5. СУТОЧНЫЙ МОНИТОРИНГ КЕТОНУРИИ И ГЛИКЕМИИ У АЛКОГОЛЬЗАВИСИМЫХ КРЫС..... | 98 |
| АНАЛИЗ И ОБОБЩЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ..... | 108 |

| | |
|--|-----|
| ВЫВОДЫ | 118 |
| ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ | 120 |
| ПЕРЕЧЕНЬ СОКРАЩЕНИЙ | 121 |
| СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ | 122 |
| ПРИЛОЖЕНИЯ | 146 |

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

Работа имеет медицинский и социальный аспекты. Распространенность алкоголизма в мире достигла огромных масштабов, ежегодный мировой уровень смертности в результате употребления алкоголя составляет 5,3%, при этом чрезмерное употребление алкоголя является пятым по значимости фактором риска преждевременной смерти и инвалидности в мире. По данным документационного центра ВОЗ за 2018 г. употребление алкоголя стало основной причиной смерти и инвалидности в развивающихся странах с низкой смертностью, третьим по значимости фактором риска после табака и кровяного давления в развитых странах и одиннадцатым - в развивающихся странах с высокими показателями смертности (46). Тяжелее всего в структуре алкогольного абстинентного синдрома купируется патологически сильное влечение к алкоголю. После лечения алкоголизма традиционными методами рецидивы запоев наблюдаются, по разным оценкам, у 20-80 % пациентов [215, 226].

Обилие в зарубежной и отечественной научной литературе патогенетических концепций алкогольной зависимости и отсутствие оптимальных мер профилактики и эффективной терапии пациентов свидетельствуют о недостаточности знаний патогенеза формирования стойкого влечения к алкоголю и определяют необходимость дальнейшего его изучения (26). Основной акцент в патофизиологических исследованиях был сделан на изучение модулирующих свойств алкоголя в отношении нейромедиаторных систем мозга (норадренергической, серотонинергической, ГАМК-ергической, опиоидной) (145, 218, 217, 150, 146). Влечение, как форму поведения, традиционно рассматривали как следствие нарушений медиаторных систем мозга, в первую – дофаминергической [110, 203] и ГАМК-эргической [133, 218]. В последние годы активно изучали возможность подавления влечения к алкоголю путем моделирования состояния активности этих и других нейромедиаторных систем [132, 219]. Но практических существенных результатов получено не было

[173], и рутинными эти методы не стали. Поэтому поиск причин, непосредственно вызывающих патологическое влечение к алкоголю, продолжается.

Современная концепция патогенеза алкогольной зависимости у пациентов в случае отказа от алкоголя постулирует главенствующую роль недостатка эндогенного ацетальдегида, образующегося из этанола с помощью альдегидокисляющих ферментов (1). Снижение концентрации ацетоальдегида сопровождается резким сокращением потребления кислорода, нарушением окислительно-восстановительных реакций, процессов образования энергии и, соответственно, функций клеток всех жизненно важных органов (мозга, миокарда, печени, почек, мышц). Формирующаяся при этом гипогликемия является результатом истощения запасов гликогена в печени и торможения глюконеогенеза, а также отражает выраженность дефицита глюкозы - универсального источника энергии для обеспечения метаболических процессов в органах ЦНС (26). При этом нарастание продукции кетоновых тел является следствием избытка и нарушения утилизации ацетила гепатоцитами при алкогольной интоксикации. Существующие в научной литературе факты свидетельствуют, что при хроническом алкоголизме реальными энергетическими резервами организма служат не гликоген, жирные кислоты и белковые структуры, а кетоны, образующиеся из экзогенного этанола с помощью альдегидокисляющих ферментов. Отсутствие поступления этанола лишает организм энергетического субстрата, эндогенный синтез которого требует больше энергии, чем та, которая запасена в нем, что в условиях дефицита глюкозы может усугублять влечение к алкоголю.

Любая форма поведения, в том числе и влечение, обусловлена потребностями организма, в первую очередь - витальными: потребностями в пище, питье и т.д. Можно предположить, что влечение к алкоголю является отражением одной из таких потребностей - потребности в энергии [34]. Эти знания используются в клинической наркологии: например, больным в состоянии острого алкогольного отравления, с целью устранения энергетического голода мозга, внутривенно вводят растворы глюкозы [90, 154, 168, 213]. Эту процедуру

проводят от одного до трех раз [16, 29] для устранения острого состояния, и прекращают. То есть применение глюкозы является симптоматическим кратковременным лечением.

Тем не менее, до настоящего времени отсутствует патогенетическая концепция роли нарушений промежуточного обмена углеводов в головном мозге и возможности их метаболической коррекции в условиях сформированного стойкого влечения к алкоголю, как формы поведения.

Степень разработанности темы

К настоящему времени накоплены многочисленные и противоречивые факты, которые в общих чертах раскрывают патогенетические механизмы формирования алкогольной зависимости. Алкогольную мотивацию и формирование зависимости исследователи связывают с гиподисфункцией ряда медиаторных систем ЦНС (норадренергической, серотонинергической, ГАМК-ергической, опиоидной), изменением активности основных ферментов метаболизма этанола в печени (алкогольдегидрогеназы и ацетальдегиддегидрогеназы). На вероятность роли метаболических факторов в формировании патологического влечения могут указывать открытия последних лет в генетике и эпигенетике. Во-первых, показано, что любые метаболические молекулы (особенно в избыточном количестве), в том числе и этанол, способны вызвать изменения экспрессии генов в ядре клетки путем воздействия на гистоны [99, 111, 144, 223]. Во-вторых, известно, что определенные гены «сцеплены», то есть экспрессия одного гена неизбежно сопровождается экспрессией другого [51, 52]. А индивидуальные пищевые предпочтения, как известно, являются проявлением состояния метаболизма в конкретном организме. То есть можно с большой вероятностью предположить, что метаболические сдвиги (переход на питание кетоновыми телами) и определенное поведение (влечение к алкоголю) неразрывно связаны между собой на генетическом уровне.

Доказано, что причиной дефицита энергии при алкоголизме является алкогольная гипогликемия вследствие угнетения этанолом ферментов гликогенолиза, глюконеогенеза (82, 196, 26). Однако, до настоящего времени

неизвестна роль метаболических нарушений промежуточного обмена углеводов в головном мозге при формировании влечения, как формы поведения. Имеются данные, что с целью компенсации нарушений углеводного обмена, организм в целом и мозг в частности переходят на иной субстрат - кетоновые тела (34, 4), что может быть основной гедонической мотивации. Таким образом, недостаточная изученность патогенеза формирования стойкого влечения к этанолу и необходимость усовершенствования методов коррекции нарушений промежуточного обмена углеводов у пациентов является важной научно-прикладной задачей.

Учитывая вышесказанное, помимо чисто теоретического, эта проблема имеет и несомненно практическое значение, поскольку ее решение даст ответ о принципиальной возможности обратимости процесса, а именно, редукции влечения к этанолу в условиях принудительного перехода с питания кетоновыми телами на питание глюкозой в алкогользависимом организме и нормализации внутриклеточного метаболизма.

Цель исследования: изучить в эксперименте патогенетические механизмы нарушений промежуточного обмена углеводов в головном мозге и возможности их метаболической коррекции в условиях сформированного стойкого влечения к алкоголю.

Задачи исследования

1. Изучить гедонические свойства глюкозы и особенности ее усвоения тканями головного мозга у животных со сформированной алкогольной зависимостью.
2. Оценить взаимосвязь выраженности кетоза и степени влечения к этанолу в процессе формирования алкогольной зависимости.
3. Установить возможность обратимости нарушений углеводного обмена у животных в условиях хронической алкоголизации и их динамику в условиях долговременной патогенетической коррекции.
4. Выявить резервные возможности углеводного обмена в тканях головного мозга у животных со сформированной алкогольной зависимостью.

5. Усовершенствовать схему патогенеза формирования стойкого влечения к этанолу на основании перестройки углеводного и энергетического обмена в головном мозге.

Научная новизна исследования

Результаты диссертационной работы расширяют и дополняют научные представления о патогенезе нарушений промежуточного обмена углеводов в различных отделах головного мозга в ходе формирования стойкой алкогольной зависимости. Впервые показана целесообразность использования в эксперименте у алкогользависимых животных показателей артериовенозной разницы (АВР) по глюкозе для головного мозга и всего организма для оценки способности к утилизации глюкозы. Впервые проведен сравнительный гистоэнзимологический анализ активности ферментов лактатдегидрогеназы (ЛДГ), глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (Г-6-ФДГ) и сукцинатдегидрогеназы (СДГ) в зонах головного мозга, ответственных за формирование патологического влечения (префронтальной коре, центральном ядре миндалевидного тела и медиальном отделе прилежащего ядра) до и после патогенетической коррекции алкогольной зависимости. Выявлены особенности патогенеза формирования стойкого влечения к этанолу в хроническом эксперименте, в основе которых лежат причинно-следственные взаимосвязи между состоянием промежуточного обмена глюкозы, перестройкой внутриклеточного метаболизма в головном мозге и степенью влечения к алкоголю. Впервые сформулирована и доказана новая гипотеза о метаболических механизмах формирования устойчивого влечения к этанолу, подтверждающая целесообразность сохранения кетоза в схемах лечения больных с хроническим алкоголизмом, целью которых является купирование устойчивого влечения к этанолу и предупреждения рецидивов.

Теоретическая и практическая значимость работы

Автором получены новые данные о степени нарушений гликолиза, пентозофосфатного пути и цикла Кребса в различных отделах головного мозга в ходе хронической алкоголизации (префронтальной коре, центральном ядре миндалевидного тела и медиальном отделе прилежащего ядра).

Продемонстрирована наибольшая взаимосвязь питьевого режима животных со снижением активности ЛДГ, Г-6-ФДГ и СДГ в медиальном отделе прилежащего ядра, что лежит в основе формирования стойкого влечения к алкоголю. Установлена возможность восстановления (обратимости) нарушений углеводного и энергетического обмена головного мозга путем повышения утилизации глюкозы головным мозгом и нормализации активности ферментов (ЛДГ, СДГ) в условиях кратковременной и долговременной (тридцатидневной) углеводной нагрузки. Помимо теоретического, эта проблема имеет и важное практическое значение. Приведены доказательства необходимости дифференцированного подхода к коррекции кетоза, сопровождающего абстинентный синдром при хронической алкоголизации, путем длительной метаболической коррекции гликемии, направленной на нормализацию углеводного и энергетического обмена головного мозга и уменьшение степени влечения к этанолу в долгосрочном периоде.

Методология и методы исследования

Эксперимент проводился в два этапа. На первом этапе моделировали алкогольную зависимость путем длительной принудительной алкоголизации (5, 48, 23). При проведении работы использовали следующие методы: физиологические, биохимические, гистоэнзимологические и статистические. С помощью физиологического метода оценивали питьевой режим животных - регистрировали потребление раствора этанола, глюкозы, воды. Так как животные отличались по весу, перерасчет выпитой жидкости делали на 0,1 кг веса в час или в сутки. Биохимические методы включали: определение концентрации кетоновых тел в моче, концентрации глюкозы в крови. Гистоэнзимологическим методом определяли активность в тканях головного мозга ЛДГ, Г-6-ФДГ и СДГ.

На втором этапе у 60 экспериментальных и 40 интактных крыс выполняли метаболическую коррекцию, включающую продолжительную (в течение 30 суток) и кратковременную (однократную) углеводную нагрузку, нейтрализацию кетоновых тел, а также сочетанную коррекцию гликемии и кетоза.

В рамках статистического метода для проверки отличия закона распределения показателей от нормального применялся критерий Шапиро-Уилка или Хи-квадрат. В зависимости от распределения данных, для сравнении значений использовались критерии Стьюдента и Фишера или W-критерий Уилкоксона и Хи-квадрат Пирсона. При сравнении трех или больше групп были использованы методы однофакторного анализа Крускала-Уоллиса и множественных сравнений (метод Шефе, метод Дана). Для анализа связи между признаками использовались методы корреляционного анализа с расчетом показателей корреляции Пирсона и ранговой корреляции Спирмена. Для разбития множества исследуемых объектов по ряду факторных признаков на однородные группы был применен кластерный анализ с использованием дивизионного метода k-средних.

Положения, выносимые на защиту

1. У животных с длительной алкоголизацией снижение способности усваивать глюкозу тканями головного мозга, даже при ее достаточной концентрации в крови, приводит к потере гедонических свойств глюкозы пропорционально сроку и тяжести алкоголизации, уменьшению ее употребления в условиях свободного выбора, увеличению суточного количества выпитого крысами этанола в ходе формирования алкогольной зависимости.

2. Снижение уровня кетонемии не влияет на степень гликемии, которая остается стабильно низкой, при этом не уменьшает, а провоцирует усиление влечения к этанолу и его потребления в условиях свободного выбора.

3. При сформированной алкогольной зависимости и стабильной гипогликемии имеет место прямая пропорциональная зависимость между потреблением этанола и уровнем кетонурии и обратная пропорциональная зависимость между уровнем кетоновых тел и желанием употребить алкоголь. Это обусловлено изменением промежуточного обмена углеводов и внутриклеточного метаболизма преимущественно в нейронах медиального отдела прилежащего ядра головного мозга.

4. Нарушения углеводного обмена в тканях мозга алкоголизированного организма в условиях долговременного моделирования нормогликемии приобретают обратимый характер, что способствует снижению влечения к этанолу и сопровождается нормализацией углеводного обмена в головном мозге, а также уменьшением кетонемии и кетонурии.

Степень достоверности и апробация результатов

Основные положения и результаты диссертации были доложены и обсуждены на 87-й Всероссийской научно-практической конференции студентов и молодых ученых, посвященной 155-летию со дня рождения Л.А. Даршкевича (Казань, 2013); Украинско-польском симпозиуме «Опыт, реалии и перспективы развития системы здравоохранения» (Львов, 2013); Международной научной конференции, посвященной 60-летию Института физиологии НАН Беларуси (Минск, 2013); 7-й Львовско-Люблинской конференции по экспериментальной и клинической биохимии (Львов, 2013); XXII съезде физиологического общества им. И.П. Павлова (Волгоград, 2013); XIX съезде Украинского физиологического общества с международным участием (Львов, 2015); 78-80-м международных Медицинских конгрессах молодых ученых «Актуальные проблемы теоретической и клинической медицины» (Донецк, 2016, 2017, 2018).

Публикации.

По материалам диссертации опубликовано 25 научных работы, в том числе 14 статей в рецензируемых научных журналах, рекомендованных ВАК (из них – три статьи без соавторов), 11 тезисов в материалах конференций, съездов и конгрессов.

Структура и объем диссертации.

Диссертация состоит из введения, обзора литературы, трех разделов собственных исследований, обсуждения результатов, выводов, списка использованной литературы (176 наименований, из которых 115 отечественных источников, 61 зарубежных источников). Текстовая часть работы изложена на 155 страницах. Диссертация содержит 15 таблиц и иллюстрирована 21 рисунком.

ГЛАВА 1

НАРУШЕНИЯ УГЛЕВОДНОГО-ЭНЕРГЕТИЧЕСКОГО БАЛАНСА МОЗГА ПРИ АЛКОГОЛЬНОЙ БОЛЕЗНИ (обзор литературы)

Главным проявлением сформированного хронического алкоголизма является непреодолимое влечение к алкоголю. Влечение к алкоголю практически не поддается преодолению. После разного рода традиционной терапии, в 20-80% [226], по другим оценкам, в 70-90% [215] пациентов наблюдаются рецидивы запоев, даже если продолжительность периодов воздержания была достаточно длительной - от полугода до 10 лет.

До сих пор отсутствует полная доказательная информация о молекулярных мишенях, с помощью которых этанол оказывает свое влияние [194]. Отсутствие такой информации является критическим барьером на пути разработки эффективных методов лечения алкогольной болезни, и прежде всего - купирования влечения к алкоголю.

Наиболее изученной причиной формирования патологического влечения к чему бы то ни было, в том числе к алкоголю, считают повреждение нейромедиаторных систем мозга: дофаминергической [91, 112, 116, 203], ГАМК-эргической [133, 218], холинергической [88, 94], глутаматергической [217], серотонинергической [110, 122], опиоидной [92, 159], адренергической [33] и др. Свидетельств о существенных нарушениях нейромедиаторного баланса при алкоголизме накоплено так много, что возникло устойчивое представление, что алкоголизм - это болезнь мозга [224]. Первенство этой причине исследователи отдают, исходя из общебиологического представления, что любое поведение животного определяется именно состоянием определенной нейромедиаторной системы [173]. Но попытки терапевтической коррекции перечисленных нейромедиаторных систем с целью подавления влечения к алкоголю желаемого ожидаемого результата не принесли [132, 159, 173, 219].

Еще одной возможной причиной влечения, как патологической формы поведения, может быть общая метаболическая альтерация клеток мозга, что приводит к нарушению их функционирования, в том числе и к нарушению нейротрансмиттерной функции [91, 108, 116, 151, 157]. Поэтому различные звенья метаболизма клетки могут рассматриваться как потенциальные мишени для химической коррекции с целью преодоления влечения.

Исходя из вышесказанного, для анализа была отобрана научная литература, в которой рассматриваются различные аспекты поражения и механизмы перестройки метаболизма клеток мозга при алкоголизме.

1.1 Метаболизм этанола в организме

Метаболизм этанола осуществляется преимущественно печенью [207]. В гепатоцитах этанол метаболизируют три ферментативные системы - алкогольдегидрогеназная, каталазная и микросомальными система оксидаз смешанной функции [176, 198, 19] (Приложение 1).

Алкогольдегидрогеназная (АлДГ) система - наиболее существенная, она метаболизирует 80-85% этанола, содержащегося в цитозоле [130]. При этом этанол превращается в ацетальдегид - токсичное и реактивное соединение. Но АлДГ зависит от НАД⁺ - кофермента, запасы которого в клетке ограничены. Именно поэтому АлДГ не индуцируется и может метаболизировать только малые или средние дозы этанола. Существуют два изофермента АлДГ, которые кодируются разными генами, имеют различную активность и пропускную способность [64]. Представители разных рас отличаются наличием АлДГ-изоферментов. Азиаты имеют преимущественно АлДГ1, который метаболизирует алкоголь примерно на 30-90% быстрее, по сравнению с европейцами, имеющими преимущественно АлДГ2 [71, 108]. Именно поэтому азиаты не переносят алкоголь ввиду быстрого образования больших количеств токсичного для мозга ацетальдегида.

Микросомальной системой оксидаз смешанной функции, локализующейся в агранулярном эндоплазматическом ретикулуме гепатоцитов, метаболизируется

около 10-15% этанола Эта система также превращает этанол в ацетальдегид [198]. В отличие от АлДГ, в случае хронического употребления алкоголя роль этой системы существенно возрастает, так как она включает НАДФН-цитохром Р450-редуктазу, которая индуцируется хроническим употреблением этанола [207]. Именно индукцией цитохрома Р450 объясняют факты роста скорости элиминации алкоголя у больных алкоголизмом и изменения интенсивности метаболизма препаратов системой цитохрома Р-450 [79]. Ферменты системы цитохрома Р450, как дополнительной системы микросомальных оксидаз, включаются в окисление этанола при превышении его концентрации в крови более 0,1 ‰ [100].

Каталазная система также превращает этанол в ацетальдегид. В норме имеет небольшую активность. Значение этой системы растет в условиях значительного поступления этанола в организм [129].

Образованный ацетальдегид в печени в дальнейшем быстро превращается в ацетат под действием альдегиддегидрогеназы (АльДГ) [178] (Приложение 1). Ацетат, в свою очередь, превращается в ацетил-КоА. Ацетил-КоА или идет на энергетические цели (окисляется до углекислого газа и воды в цикле трикарбоновых кислот с образованием 12 молекул АТФ), или же идет на пластические цели (конденсируется и превращается в кетоновые тела (ацетоацетат) и жирные кислоты) (Приложение 2). Направление реакции зависит от активности соответствующих ферментов, соотношения количества исходных и конечных продуктов реакций. Так как при алкоголизме цикл трикарбоновых кислот подавлен [207], то реакция сдвигается в сторону образования из ацетил-КоА именно кетоновых тел [86] и жирных кислот [182].

Гену, кодирующему синтез альдегиддегидрогеназы, свойствен полиморфизм (существует минимум две изоформы данного фермента). Со склонностью к алкоголизму связывают аллель гена, которая кодирует изоформу альдегиддегидрогеназы-2 [70, 71, 108]. АльДГ2 является «медленной» изоформой, которая имеет малую пропускную силу, и образованный ацетальдегид долго циркулирует в организме. Особенно много токсичного ацетальдегида

накапливается, когда «быстрая» изоформа АДГ1 сочетается с «медленной» изоформой АльДГ2.

«Медленная» изоформа АльДГ2 выполняет роль естественного защитного механизма от алкогольной зависимости, потому что вызывает ранний нарастающий дискомфорт от употребления алкоголя.

Намного меньше подобных исследований относительно метаболизма этанола в нервной ткани. Лишь единичные работы посвящены изучению активности ферментов биотрансформации этанола в нейронах [105, 124, 206] и в клетках нейроглии [138] при алкоголизации. Было установлено, что этиловый спирт метаболизируется не только в печени, но и непосредственно в тканях головного мозга - сначала до ацетальдегида (но не с помощью алкогольдегидрогеназы, а преимущественно с помощью каталазы), а затем до ацетата (при участии альдегиддегидрогеназы).

1.2 Повреждающее влияние этанола на мозг

Много лет господствовала догма, что этанол непосредственно мозгом не усваивается, потому что не проходит через гематоэнцефалический барьер. Поэтому была популярна гипотеза о том, что характерные эффекты этанола на центральную нервную систему опосредуются через ацетальдегид. Однако, было установлено, что этанол из крови в мозг проникает путем пассивной диффузии с достаточно высоким объемом распределения: 0,6-0,7 мл / кг. Более того, этанол обладает выраженной органотропностью: в мозге его концентрация превышает содержание в крови [14].

Основные положения современной теории острого воздействия алкоголя на мозг: молекулы этанола, будучи жирорастворимыми, во-первых, проходят через фосфолипидные мембраны внутрь нейронов, во-вторых, специфически связываются с некоторыми рецепторами мембраны, в-третьих, специфично ковалентно связываются с различными белками, нарушая их естественную третичную структуру [35]. Это было выявлено с помощью позитронно-эмиссионной томографии (ПЭТ) и других методик нейровизуализации с

использованием радиоактивных меток. Именно ПЭТ позволила выяснить молекулярные мишени в мозге для этанола и связать их с клиникой и поведением [14]. Использование этого метода сыграло решающую роль в понимании различных изменений в медиаторных системах в ходе развития зависимостей. Сегодня ПЭТ успешно используется для сканирования пациентов с целью выявления группы риска предрасположенности к развитию зависимостей, для мониторинга эффективности терапии зависимостей [100].

Известен факт неспецифического конформационного повреждения белков под влиянием этанола. Молекулы этанола имеют чрезвычайно высокую химическую реактивность благодаря наличию полярной гидроксильной группы [9]. Благодаря ей они способны неферментативно связываться с активными группами цитоплазматических и мембранных белков клетки. Так как при этом образуются прочные ковалентные связи, то меняется естественная третичная структура белков, то есть происходит их денатурация. В результате белки инактивируются и не могут выполнять свои специфические функции (ферментов, рецепторов, каналов, насосов, транспортеров и пр.). Происходят ультраструктурные нарушения мембран и абсолютно всех органелл клеток. Так реализуется глобальный альтерирующий эффект этанола.

Например, связываясь с белками, образующими ионные каналы, этанол тем самым нарушает их конформационную структуру. Это влияет на проницаемость натриевых каналов, меняет электролитный состав и провоцирует гипонатриемию. Это стимулирует экспрессию белков аквапоринов-4 и повышение проницаемости клеточных мембран для молекул воды. В результате развивается отек мозга [128]. Меняется соотношение структурных фракций воды: увеличивается содержание свободной и уменьшается содержание связанной воды. Эти нарушения при однократном введении этанола являются основной причиной «растворяющего» эффекта алкоголя на мембраны клеток и первичного неспецифического механизма его действия на ткани [46].

Также молекулы этанола непосредственно связываются на плазматических мембранах с рецепторами кальциевых каналов [181], калиевых каналов [169] и

долгое время удерживают эти каналы в открытом состоянии. Неконтролируемый вход кальция в клетку и выход калия из клетки, во-первых, значительно нарушают потенциал покоя и возбудимость клетки. Во-вторых, вслед за кальцием, по осмотическому градиенту, в клетку поступает большое количество молекул воды, вызывая осмотическое разрушение мембраны.

Альтегрирующий эффект этанола на нервную ткань обусловлен способностью этанола непосредственно связываться с белковыми молекулами циторекцепторов для нейромедиаторов: ГАМК, глутамата, дофамина, ацетилхолина, АТФ и пр. [181, 194]. Причем характер такого связывания может быть разный. Например, NMDA-рецептор алкоголь ингибирует обратимо, не конкурируя с глутаматом за центр связывания NMDA-рецептора [184]. Обнаружено, что центр связывания этанола с NMDA-рецептором находится в 3 и 4 трансмембранных доменах NR1 и NR2A субъединиц [185, 221]. На молекулу ГАМК-рецептора этанол может влиять как непосредственно: связываясь с ней [186], так и опосредованно, через нейроактивных стероиды [136], модулируя тем самым функции ГАМК-рецепторов [145]. Причем эффект этанола не ограничивается только модуляцией функций ГАМК-рецепторов, он может напрямую регулировать высвобождение ГАМК из везикул, так как проникает внутрь терминалей [192]. Нарушается нормальное образование вторичных мессенджеров в клетках и дальнейшее фосфорилирование протеинкиназы, а значит, и нормальная активация соответствующих ферментов. В результате существенно меняются эффекты нейротрансмиссии. Поэтому сформировалось устойчивое мнение: характерные функциональные нарушения в мозге и соответствующие им поведенческие и сомато-вегетативные проявления при остром и хроническом воздействии алкоголя вызваны не только непосредственно самими молекулами этилового спирта или его метаболитов, но и изменениями функционирования нейромедиаторов, активность и выделение которых инициируется и / или тормозится этиловым спиртом.

Чем продолжительнее период употребления этанола, тем больше объем желудочков мозга и меньше объем белого вещества мозга. Вероятно, это связано с

демиелинизацией нервных волокон. Молекула этанола способна разрушать миелин. Причем уменьшение объема белого вещества наблюдается во всех отделах - в лобной и височной коре, мозолистому теле, мозжечке, с некоторыми гендерными различиями: у женщин деградация происходит быстрее, чем у мужчин. Степень восстановления белого вещества мозга прямо пропорциональна продолжительности периода воздержания от алкоголя [104].

1.3 Влияние метаболитов этанола на головной мозг

Несмотря на то, что печень первой сталкивается с этанолом и метаболизирует его, все же алкоголизм считают болезнью мозга [34, 224, 242]. Непосредственное токсическое воздействие на мозг оказывает не только сам этанол, но и его ближайший метаболит - ацетальдегид, а также кетоновые тела и протоны. Ниже рассмотрены альтерирующие эффекты этих молекул и явлений.

Ранее традиционно считалось, что непосредственный и самый сильный эффект на мозг и на поведение производит молекула не столько этилового спирта, сколько его первого и основного метаболита - ацетальдегида [96, 151]. Определенное количество ацетальдегида не претерпевает превращения в печени и попадает в кровоток. В дальнейшем молекулы ацетальдегида легко проходят через гематоэнцефалический барьер и попадают в мозг [151, 178,54].

Молекула ацетальдегида является химически активной благодаря наличию полярной альдегидной группы [1]. Благодаря ей ацетальдегид связывается с фосфолипидами плазматических мембран, остатками аминокислот и сульфгидрильными группами, поражает мембраны путем деполимеризации белков, вызывая изменения в поверхностных антигенах. Усиливается перекисное окисление липидов [215]. Это приводит к разрушению мембран и некрозу. В клетках ацетальдегид связывается с тубулином и повреждает микротрубочки цитоскелета. Он взаимодействует с серотонином, дофамином и норадреналином, образуя фармакологически активные соединения, а также стимулирует синтез проколлагена I типа и фибронектина.

Также к токсическим эффектам ацетальдегида относятся: нарушение митохондриальной цепи переноса электронов, ингибирование репарации ядра, образование комплексов с белками, усиление синтеза коллагена. Обнаруживается набухание митохондрий и изменения их крист, в митохондриях подавляется окисление жирных кислот и ацетальдегида, снижается активность цитохромоксидазы, цепи дыхательных ферментов, подавляется окислительное фосфорилирование [15]. Системными проявлениями таких эффектов ацетальдегида являются тошнота, рвота, головокружение, тахикардия и т.д. Эти эффекты используются как фармакологический способ лечения алкоголизма, который заключается в искусственном повышении ацетальдегида в крови. С этой целью используют препарат дисульфирам, который ингибирует фермент ацетальдегиддегидрогеназу, поэтому ацетальдегид не превращается в ацетат и накапливается в организме [129, 52]. Накопление ацетальдегида вызывает ряд тяжелых физиологических последствий: тошноту, рвоту, головокружение, тахикардия и т.д. Пережив это, пациент может прекратить употреблять алкоголь [103, 155]. В эксперименте алкогользависимые крысы после применения дисульфирама и повышения ацетальдегида в крови уменьшали потребление алкоголя на 60-80% ($p < 0,001$) [129].

Но в последние годы стали появляться работы, которые подвергают сомнению непосредственную роль ацетальдегида, как негативного фактора для мозга. В этом вопросе есть неясности и противоречивые данные. Во-первых, есть данные, что ацетальдегид плохо проникает из крови в мозг [96]. Во-вторых, его дозы не соответствуют эффектам. Непосредственное введение ацетальдегида в мозг не дает таких же поведенческих, соматических и вегетативных эффектов, как употребление алкоголя. Прямые измерения показали, что после употребления этанола *per os* концентрации ацетальдегида в мозге очень небольшие - порядка нескольких микромолей. Но для получения таких же эффектов при непосредственном введении ацетальдегида в мозг необходимо использовать гораздо большие его концентрации - на один-три порядка выше. В-третьих, стимуляция каталазы теоретически должна приводить к повышению уровня

ацетальдегида в мозге; но это не удалось непосредственно показать в экспериментах. Соответственно, ингибирование каталазы должно было приводить к снижению концентрации ацетальдегида в природных условиях, но это не было непосредственно продемонстрировано. Хотя ингибирование альдегиддегидрогеназы приводило к увеличению как периферического, так и центрального ацетальдегида и к потенцированию поведенческих эффектов этанола [96]. Все это говорит о том, что представления о роли ацетальдегида в развитии алкогольной зависимости нуждаются в корректировке.

В результате актуален экспериментальный поиск новых фактов, которые могли бы пролить свет на природу влияния системного кетоза на метаболические процессы головного мозга при алкоголизме.

1.4 Нарушение углеводного обмена в тканях головного мозга при алкоголизме

Алкогольная болезнь - системное заболевание, при котором наблюдаются метаболические нарушения обмена углеводов, липидов, пуринов, мочевой кислоты, витаминов [196]. Самой распространенной формой алкогольной болезни являются печеночная и мозговая (существует даже термин "алкогольная ось: печень-мозг") [15, 182]. Также часто повреждаются почки, сердце, костный мозг, желудочно-кишечный тракт [196].

При хроническом употреблении алкоголя алкогольдегидрогеназная система печени всегда находится в состоянии напряжения, поэтому утилизирует значительное количество НАД⁺ клетки. Соотношение НАД⁺/ НАДН смещается в сторону НАДН [5, 121, 213]. Следовательно, другие ферменты, которые также используют НАД⁺, вынужденно оказываются в состоянии недостаточной активности, даже в условиях достаточно большого количества субстратов для этих ферментов. К таким НАД⁺ зависимым ферментам относятся ферменты глюконеогенеза, лактатдегидрогеназа, малатдегидрогеназа, глицерин-3-фосфатдегидрогеназа (Приложение 3). Образование глюкозы замедляется и уменьшается [121, 154]. Как следствие - развивается гипогликемия [154]. В норме, между

приемами пищи, около 90% (до 250 г в сутки) глюкозы поступает в кровеносную систему из печени. Кроме того, причиной гипогликемии становится и непосредственное повреждение поджелудочной железы, где синтезируются глюкозорегулирующие гормоны: инсулин, глюкагон [38, 174, 182]. Гипогликемия разной степени выраженности - обязательный компонент алкогольной болезни [154, 196].

Известно, что даже однократное пероральное введение этанола крысам значительно снижает концентрацию глюкозы в плазме, а в печени снижает активность двух ключевых ферментов глюконеогенеза: пируваткарбоксилазы, фруктозодифосфатазы; а также одного из ферментов гликолиза - фруктозо-1,6-альдолазы. А внутривенное введение этанола приводит к быстрому (в течение 10-15 минут) уменьшению в печени активности фосфофруктокиназы, пируваткиназы, фруктозодифосфатазы и фруктозо-1,6-альдолазы. Внутривенное введение этанола значительно (на 60%) повышает в печени концентрацию цАМФ в течение 10 минут, тогда как пероральное введение не меняет цАМФ. При этом пероральное введение фолиевой кислоты имеет защитный эффект против уменьшения активности ферментов, и как следствие - против нарастания гипогликемии [55].

Даже пренатальная алкоголизация приводила к гипогликемии у крысят в постнатальном периоде (тестирование проводили в 15, 30 и 60 день постнатального периода). У этих крысят в гомогенате печени была повышена активность фосфоорилазы, но уменьшена активность глюкозо-6-фосфатазы, альдолазы, глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы. Был повышен индекс лактат / пируват. Это свидетельствует о стабильной гипогликемии, угнетении пентозофосфатного пути метаболизма глюкозы, накоплении лактата в печени [164]. Снижение активности фосфатдегидрогеназы зафиксировано и у людей, злоупотребляющих алкоголем [54].

В свою очередь, дефицит глюкозо-6-фосфатазы делает невозможным гликогенолиз, что приводит к опасной для жизни гипогликемии, накоплению в

гепатоцитах гликогена (гликогеноз, или болезнь фон Гирке), перерождению печени (гепатоцеллюлярная карцинома) [53].

Хроническая алкоголизация крыс в течение 3 месяцев (8 г / кг) меняла экспрессию ключевых ферментов глюконеогенеза (фосфоенолпируват карбоксикиназы, глюкозо-6-фосфатазы) и гликогенолиза (гликоген-синтазы-киназы). В эксперименте *in vitro* аппликация этанола в гепатоциты в течение 48 часов также приводила к аналогичным изменениям [65].

Хроническое употребление алкоголя сопровождается снижением аппетита, что также способствует гипогликемии. В условиях хронической гипогликемии значительно уменьшается активность ферментов гликолиза - гексокиназы, глюкокиназы («за ненадобностью») [82].

1.5 Причина алкогольной кетонемии

При большом количестве этанола цепочка «этанол → ацетальдегид → ацетат → ацетил-КоА» приводит к образованию большого количества ацетил-КоА. Избыток ацетил-КоА не может быть полностью утилизирован в цикле трикарбоновых кислот, поэтому превращается или в кетоновые тела, или идет на синтез липидов [121, 49] (Приложение 2).

Снижение активности цикла трикарбоновых кислот под воздействием этанола происходит по двум причинам: дефицита НАД⁺ и снижение экспрессии генов, кодирующих ферменты, отвечающие за утилизацию ацетил-КоА: ацил-КоА-дегидрогеназы, ацил-КоА-оксидазы, ацил-КоА-синтетазы [86, 207].

Образованию липидов способствует то, что под влиянием этанола активируются гены, кодирующие ферменты глицеринкиназу и глицерин-3-фосфат-дегидрогеназу, которые задействованы в синтеза триглицеридов в печени [229]. Также этанол ингибирует бета-окисление жирных кислот [207]. Избыток молекул липидов откладывается в гепатоцитах в виде жировых капель, которые заполняют собой всю клетку [229]. Как следствие - развивается жировое перерождение печени - стеатоз (жировой гепатоз) [15, 86, 182, 205, 207].

Стеатозная печень выбрасывает в кровоток так называемые «токсичные липиды», или керамиды, которые, будучи жирорастворимыми, проникают в мозг и осуществляют прямое повреждение мембран, нарушая их сигнальную функцию. В результате, нейроны теряют способность принимать определенные раздражители, нарушаются процессы трансдукции в ядрах. Так осуществляется нейродегенеративное влияние через ось «печень-мозг» [121, 182]. В нейронах гипоталамуса, гипофиза появляются липидные капли, дегенеративные вакуоли [205].

Кетоновые же тела из печени попадают в кровоток, проходят через гематоэнцефалический барьер (ГЭБ) и имеют полезное приспособительное (питательное) значение [170, 54]. Кетоновые тела представлены тремя молекулами: гидроксибутират ($\approx 70\%$), ацетоацетат ($\approx 29\%$) и ацетон ($\approx 1\%$).

Ацетоацетат используется тканями организма как энергетический субстрат. Гидроксибутират является транспортной формой. В клетках мозга и мышц кетоновые тела превращаются обратно в ацетил-КоА, который утилизируется в ЦТК (Приложение 4). Окисление одной молекулы гидроксибутирата дает 26 молекул АТФ: три молекулы образуются в цитозоле, и 24 в митохондриях - цикле трикарбоновых кислот; но одна молекула тратится на транспорт через мембрану митохондрии. Это, конечно же, меньше, чем при окислении молекулы глюкозы (36 молекул АТФ), но в условиях гипогликемии это эффективный альтернативный путь выработки макроэргов, поэтому именно кетоновые тела становятся главными «топливными» молекулами для организма [54, 170] и способны обеспечивать мозг топливными субстратами на 50% от общей потребности [45]. (Сама же печень не способна использовать кетоновые тела на свои энергетические потребности, поскольку не имеет соответствующих ферментов для их утилизации). Ацетон не утилизируется организмом. Эта летучая молекула выводится в составе мочи, пота, слюны, испаряется с поверхности легких.

В условиях алкогольной гипогликемии кетоновые тела образуются также из жирных кислот [15, 38, 102] (Приложение 2). Жирные кислоты, в свою очередь,

образуются в результате распада триглицеридов в адипоцитах жировых депо (поэтому для алкозависимых больных характерна худоба, тонкий слой подкожной жировой клетчатки). Образование кетоновых тел из жирных кислот сопровождается образованием большого количества свободных ионов водорода. Поэтому этот процесс всегда сопровождается ацидозом (кетоацидоз). Ацидоз может достигать такой степени, что вызывает ацидотического кому, необратимые повреждения тканей и даже летальный исход.

Образование кетоновых тел, как приспособительная реакция в ответ на энергетический голод клеток, возможно при различных ситуациях: алиментарный голод [220] и алкоголизм [90, 154, 220] (по причине дефицита глюкозы в крови), сахарный диабет [38, 102, 200], панкреатит [89] (по причине дефицита инсулина и невозможности проникновения молекул глюкозы в клетку) и т.д. Развитие кетоза в ответ на внутриклеточный дефицит глюкозы является обязательным – степень корреляции выраженности кетоза с гипогликемией - $r = 0,731$ (на основании исследования 1781 случая) [143].

Между уровнем гликемии и кетоза существует обратная связь: чем ниже уровень гликемии, тем более выражен кетоз. Например, чрезвычайно низкому содержанию глюкозы в крови - 1,46 ммоль / л (95% ДИ: 0,1-4,2 ммоль / л) - соответствует чрезвычайно высокое содержание бета-оксибутирата: 7,66 ммоль / л (95% ДИ: 6,42-8,75 ммоль / л) [243]. Существует сильная обратная связь между уровнем гликемии и содержанием ацетона в выдыхаемом воздухе [137]. Хотя есть также данные, что индуцированный алкоголем кетоацидоз может ассоциироваться и с нормальной гликемией [154].

В норме общее содержание всех кетоновых тел в крови человека колеблется в значительных пределах: 13-185 мкмоль / л или 1,5-20,0 мг / л. В норме с мочой кетоновых тел выводится 20-40 мг в сутки [2, 141].

Для диагностики состояния уровень ацетонемии предлагается использовать как маркер кетоацидоза [115]. Содержание отдельно ацетона более 2 мг / л считается значительным, и может считаться маркером выраженного кетоацидоза [91].

Хотя чаще, для рутинных потребностей, практически удобно измерение содержания не ацетона, а гидроксибутирата [126]. Именно бета-гидроксибутират считают лучшим маркером кетоацидоза, потому что ацетон может образовываться и по другим причинам, не связанным с кетоацидозом, например из изопропанола, который образуется в реакции брожения глюкозы в кишечнике [62, 212]. Вторая причина, почему гидроксибутират преимущественно рекомендуют для использования в качестве маркера кетоацидоза - его концентрации выше, чем ацетона. Так, при достижении концентрации гидроксибутирата 250 мг / л, ацетон в крови не определяется, то есть практически отсутствует [115].

Методами качественного измерения кетоновых тел в моче в лабораторных условиях являются цветные пробы Ланге, Легал, Лестрад и Герхарда. Методом количественного измерения кетоновых тел (вместе и по отдельности) в крови и моче является селективная газовая хроматография, масс-спектрокопия [98, 115, 141, 33, 22, 37].

1.6 Изменение кислотно-щелочного равновесия при алкоголизме

Алкогольный метаболический кетоацидоз считают самым распространенным заболеванием у больных алкоголизмом [59, 60, 86, 90, 98, 115]. Непосредственной причиной летальности при алкогольном отравлении является именно кетоацидоз [142, 170, 176, 243]. Факт, что летальность вызвана именно ацидозом, а не другими факторами, сопровождающими алкоголизм, доказан с помощью математических моделей [243].

Образование кетоновых тел сопровождается образованием большого количества протонов [5]. Ионы протонов имеют положительный заряд, поэтому влекут за собой так называемый анионный провал, то есть соответствующую недостачу отрицательных ионов [59, 90, 126, 142, 158, 212]. Вследствие этого нарушается одна из важнейших констант гомеостаза – электронейтральность всех сред организма. Несоблюдение электронейтральности сразу же влечет за собой нарушение всех процессов, связанных с генерацией потенциалов,

электрохимическим транспортом через мембраны. Как следствие – нарушение и даже несостоятельность функционирования ЦНС (головокружение, потеря сознания), нарушение психики. Нарушения электролитного и кислотно-щелочного баланса проявляются в виде гиповолемии, гипокалиемии, гипофосфатемии, гипомагниемии, гипокальциемии, азотемии, метаболического ацидоза, респираторного алкалоза [59, 90, 102, 212]. А обмен железа нарушается настолько сильно, что железо накапливается в печени и повреждает ее [171], предложено степень дефицита сывороточного трансферрина использовать как биомаркер алкогольной болезни [172].

Ацидоз может провоцировать следующие явления: тошноту, рвоту [59, 126], боль в животе, потерю сознания [59], жажду, гиперурию, головную боль, общую слабость, одышку, тахикардию [102], сердечную слабость, дисфункцию печени, гипотонию, тахипноэ [142], гипотермию, гипоксию, кровоизлияния, респираторный ацидоз. Летальный уровень алкогольной ацетонемии достигает 17,9 мг / 100 мл (ДИ 3-67) [62]. В последние годы начали появляться работы, в которых доказывается, что еще большее токсическое действие оказывает изопропанол, который конвертируется в ацетон [62, 212].

Для мозга выраженный кетоацидоз может иметь такие последствия: демиелинизация нервных волокон, некроз мозолистого тела [90], что влечет за собой постепенное изменение психики, ригидность мышц [90], острый некроз мышц, субъядерную вакуолизацию [170, 243], энцефалопатию Вернике (по причине дефицита тиамин в ЦНС) [223], отек мозга [102].

1.7 Алкогольиндуцированный окислительный и воспалительный стресс

Окислительный стресс – еще одна причина альтерирующего влияния этанола. Проникнув внутрь клетки, этанол включается в ее метаболизм и индуцирует окислительный стресс [222], который оказывает пагубное влияние на клетку. Окислительный стресс обусловлен переходом на альтернативный путь окисления этанола с помощью каталазы, а не с помощью алкогольдегидрогеназы

(ее количество в мозге невелико). Фермент каталаза в 4-5 раз активнее алкогольдегидрогеназы. В норме за счет каталазы окисляется только 10% этанола, но когда концентрация спирта в крови начинает превышать 1 ‰, активность каталазы возрастает. Сдерживающим же моментом для роста активности алкогольдегидрогеназы является дефицит ее кофактора НАД⁺ и лимит реокисления НАДН в НАД⁺. Каталаза же не использует НАД⁺ или другие акцепторы электронов, а окисляет спирты в присутствии перекиси водорода, что влечет за собой образование в значительном количестве свободных радикалов и перекисных продуктов, которые, в свою очередь, провоцируют перекисное окисление липидов (это проявляется в повышении малонового диальдегида [49]) и приводят к нарушению транспортных и других функций липидных мембран [14]. Антиоксидантный ресурс нервных клеток сначала напряженно повышается (это проявляется в увеличении активности супероксиддисмутазы, каталазы и восстановленного глутатиона [49]), а затем истощается [47]. Алкогольиндуцированное свободнорадикальное окисление липидов сопровождается накоплением липогидропероксидов и вторичных продуктов – реакционноспособных карбонильных соединений, таких как малоновый диальдегид, метилглиоксаль, инициируя так называемый дикарбонильный стресс (26). Это усиливает снижение активности ключевого фермента антиоксидантной системы организма глутатионпероксидазы, вследствие чего свободнорадикальное окисление приобретает аутокаталитический характер. В результате активации перекисного окисления липидов повреждаются различные органеллы клетки, имеющие фосфолипидные мембраны: микротубулярный аппарат, митохондрии [138], ядро [228].

Наиболее чувствительными к усилению процессов свободно-радикального окисления и основными акцепторами активных форм кислорода являются белки. В результате их взаимодействия с активными формами кислорода возникает как обратимая, так и необратимая окислительная. Конформационные изменения белков являются основополагающими факторами перестройки внутриклеточного метаболизма: функционирования рецепторов, мембранных транспортных систем,

изменении скорости биохимических реакций, регуляции фаз клеточного цикла, транскрипции, репликации, гибели клеток и других процессов (26).

Известна еще одна причина альтерирующего влияния этанола – это воспалительный стресс. Алкоголь стимулирует воспалительные реакции. С помощью методов полимеразной цепной реакции (ПЦР), иммуноферментного анализа (ИФА), иммуногистохимии и гистохимии у хронически алкоголизированных крыс исследовали маркеры воспаления и маркеры гибели клеток: цитокины, хемокины, активность оксидазы НАДФН, активные формы кислорода, также изучали морфологию микроглии [209]. Повышение провоспалительных цитокинов наблюдали в крови и в мозге сразу и через 24 часа после введения этанола. Причем локальные воспалительные реакции в мозге хранились дольше, чем системные в крови. Повышение уровня цитокинов мозга совпадало с повышением активации микроглии, активности оксидазы НАДФН, супероксидов и маркеров нейродегенерации (активированной каспазы-3 и Fluoro-Jade B) [209].

Воспалительные реакции тормозят нейрогенез во всех структурах мозга, в том числе и гиппокампе, что считается одной из существенных причин негативного влияния алкоголя на память. Это связано с мощной индукцией цитокина интерлейкина-1 β (ИЛ-1 β) и белков инфламасомов NALP1 и NALP3 как в телах нейронов, так и в астроцитах. Блокада же синтеза цитокинов ИЛ-1 β с помощью ингибиторов инфламасомов Parthenolide и Bay11708 в значительной мере отменяла вызванное этанолом торможения нейрогенеза. Торможение цитокинов имеет терапевтическое значение для лечения когнитивных нарушений, связанных с дисфункцией гиппокампа у людей, страдающих алкоголизмом. В экспериментах на алкоголизированных крысах изучалось влияние на нейроны гиппокампа и энторинальной коры провоспалительных цитокинов ИЛ-1 β . Так, добавление антител, нейтрализующих цитокины ИЛ-1 β , или блокада ИЛ-1 β -рецепторов антагонистами отменяли угнетающее действие этанола на нервные клетки [244]. Биологическая роль интерлейкина-1 β в метаболизме клеток настолько велика, что существует мнение, что с системой внутриклеточных

цитокинов, в частности ИЛ-1 β , может быть связано влечение к этанолу. Интерлейкин-1 β может модулировать потребление этанола у крыс с разным уровнем его предпочтения [27].

1.8 Влияние на мозг гипогликемии

Поскольку клетки мозга в качестве энергетического субстрата способны использовать лишь молекулы глюкозы (так как не имеют ферментов для окисления жиров, белков), не способны синтезировать глюкозу из других субстратов (так как не имеют ферментов для глюконеогенеза), практически не имеют гликогена, то ясна чрезвычайная важность именно для мозга поддержания константы гликемии. Физиологические последствия гипогликемии интерпретируются именно для ЦНС. Поэтому выдвинуто предложение зарезервировать термин гипогликемия для мозга, а клинический синдром, к которому она приводит, назвать нейрогликопенией [134]. Этот клинический синдром заключается в нейродеструкции [163], которая обусловлена энергетическим голоданием.

Из-за дефицита глюкозы ингибируется цикл Кребса, снижается образование АТФ в митохондриях. Активность клеточного метаболизма снижается. С помощью позитронно-эмиссионной томографии и использованием 18F-фтордезоксиглюкозы такое снижение у людей было обнаружено в лобной доле, премоторной коре, скорлупе, в теменной коре [189], мозжечке, таламусе, затылочной коре [54].

В свою очередь, хронический энергетический голод служит сигналом для запуска каскада апоптотических реакций [124], так как клетка не может поддерживать нормальный уровень жизнедеятельности. Кроме того, показано, что молекула этанола способна и непосредственно стимулировать каспазу-3 [209] и другие программные про-апоптотические белки клетки – например, так называемый programmed cell death protein 4 (PDCD4) – белок запрограммированной клеточной смерти [206].

Апоптическую гибель нейронов активно инициируют и вышеописанные факторы окислительного стресса-свободные радикалы. Массовый апоптоз клеток мозга при алкоголизме – чрезвычайно характерное явление [79]. Например, в префронтальной коре алкоголиков количество нейронов уменьшено на 15-23% [226]. Плотность нейронов негативно коррелирует с продолжительностью употребления алкоголя [210]. Причем плотность нейронов у больных алкоголизмом значительно снижена независимо от возраста [67]. Нейродегенерация, вызванная алкоголизмом, значительно превышает естественную потерю нейронов у здоровых людей, связанную со старением [140].

Массовый апоптоз нейронов является причиной уменьшения общего объема мозга и вызывает когнитивный дефицит у экспериментальных животных [109, 127, 147]. У людей страдают когнитивные функции: внимание, зрительная и рабочая память [47]. Алкоголь ухудшает память и объем гиппокампа не только у матерей, злоупотреблявших алкоголем, но и у их детей [193], причем не только в раннем, но даже в подростковом возрасте [177]. Алкоголизация беременных самок крыс снижает число рожденных крысят в помете, а также их массу тела и мозга, которые остаются пониженными вплоть до 7 недель постнатального развития [49]. У пренатально алкоголизированных крысят наблюдали выраженные морфологические изменения нейронов: уменьшение длины дендритов и аксонов, степени ветвистости и плотности дендритного дерева. Причем в данном эксперименте беременные самки получали достаточно умеренные дозы алкоголя – всего лишь 5 % раствор этанола [114].

При ускорении гибели клеток происходит активация нейроно-глиального взаимодействия, которая носит компенсаторно-приспособительный характер [12, 209]. Это проявляется в увеличении плотности нейроглиоцитов [11], в увеличении объема олигодендроцитов, астроцитов, которое было обнаружено иммуногистохимическим методом, с окраской гистологических срезов по Нислю. При этом степень изменений мозга коррелировала с характерным поведением алкогользависимых крыс [105]. Значительное снижение плотности, уменьшение объема нейронов в сочетании с увеличением плотности нейроглиоцитов

считаются морфологическими признаками длительной алкогольной интоксикации, сохраняющиеся и после ее отмены [11]. Но в отношении нейроглии данные противоречивы. Описано исследование, в котором делали крысам инъекции этанола (3 г / кг) с 35 по 45 дни постнатального периода (аналог подросткового возраста человека). Затем в 100-дневном возрасте проводили стереологический анализ нейронов и глии в префронтальной коре и базолатеральном ядре амигдалы. У самцов в префронтальной коре обнаружили статистически значимое не увеличение, а, наоборот, уменьшение плотности глиальных клеток. А вот число нейронов при этом не менялось. В амигдале число глиальных и нервных клеток также не изменялось [113].

В этом же контексте: есть и данные о том, что введение этанола 10-дневным крысятам, подвергшимся гипоксии, оказывало не проапоптотическое, а наоборот, нейропротекторное действие. На молекулярном уровне это выражалось в снижении экспрессии белков апоптоза, в том числе каспаз-3, Bcl-2-ассоциированного X-протеина и апоптозиндуцирующего фактора, а также в уменьшении соотношения АДФ / АТФ [125].

Много исследований посвящено изучению негативных последствий алкоголизации и энергетического голода, который она провоцирует. Гипогликемическая кома алкогольного генеза, если ее вовремя не устранить, приводит к летальному исходу [168]. Описан случай, когда голодание в течение двух дней на фоне употребления алкоголя привело к критическому снижению глюкозы в крови – менее 20 мг/дл. Такая выраженная гипогликемия привела к гибели мозга по данным компьютерной томографии. Даже вливание 50% декстрозы не улучшило неврологические реакции – пациентка в течение 10 месяцев оставалась в вегетативном состоянии [154]. В случаях менее выраженной гипогликемии введение ноотропных препаратов, которые улучшают утилизацию мозгом глюкозы, кислорода, усиливают синтез АТФ [30], облегчает состояние пациентов, больных алкоголизмом [23].

Существует мнение, что в основе многих нейродегенеративных болезней не только алкогольной, но и любой другой этиологии (например, паркинсонизм,

старение) лежат именно нарушение метаболизма глюкозы, повреждение ферментов глюкофосфатаз [227]. В культуре первичных нейронов, полученных из дрозофилы и мыши, с помощью ПЭТ показано, что восстановление активности глюкофосфатаз было фактором нейропротекции [227].

К энергетическому голоданию мозга приводит не только гипогликемия, но и ослабление гликолиза за счет отвлечения утилизации глюкозы в пентозо-фосфатный шунт, где она превращается в рибозы и нуклеиновые кислоты. Этому способствует аномальная экспрессия транскетолаз – ферментов, которые заняты в пентозо-фосфатном шунте. В свою очередь, их аномальная экспрессия, по принципу отрицательной обратной связи, обусловлена хроническим дефицитом тиамин (витамина В1), который является коферментом транскетолаз [63].

Хроническая гипогликемия влечет за собой сначала функциональное перенапряжение гормонов гипоталамо-гипофизарной оси, а затем нарушение функционирования этой системы, так называемое «перепрограммирование» [205]. Снижение аппетита при алкоголизме является следствием нарушения регуляторных пептидов и нейротрофических факторов [160].

1.9 Природа изменений внутриклеточного метаболизма при алкоголизации

Выше приведены те многочисленные изменения на системном, органном и клеточном уровнях, к которым приводит непосредственное действие этанола и его метаболитов. Поначалу долгие годы наука шла по пути накопления подобных фактов. Но параллельно предпринимались и многочисленные попытки объяснить механизмы этих изменений. В результате было доподлинно установлено, что значительным повреждениям подвергались именно ферментативные системы [198]. Несостоятельность одних ферментов или, наоборот, чрезмерная активность других приводит к характерным метаболическим алкогольным симптомам: гипогликемии, кетоацидозу, апоптозу и многим другим, перечисленным выше [79]. Генетические и эпигенетические исследования обнаружили, что при алкоголизме изменяется не только активность ферментов в реакциях, но и

процесс синтеза белковых молекул ферментов. Однако, даже такая прогрессивная современная технология, как генетический анализ, идет по пути простой констатации фактов: перечисляются белковые молекулы, синтез которых повреждается; но при этом не дает ответа на вопрос, почему именно эти, а не другие, конкретные ферментные системы повреждаются.

В последнее десятилетие, с развитием эпигенетики, установлено, что этанол может проникать в ядро, но воздействовать (причем сильнее, чем ацетальдегид [99]) не на сам хроматин (молекулы ДНК), а на гистоны (белковые молекулы, на которые «накручены» длинные нити ДНК) [80]. Это влияние проявляется в модификации белковых хвостов гистонов. На сегодня известны следующие возможные механизмы модификации хвостов гистонов: ацетилирование, метилирование, убиквитинирование, фосфорилирование [51, 52] (Приложения Ж, З). Этанол, как фактор, влияет именно на процесс ацетилирования, а именно: он подавляет ацетилирование аминокислоты лизина с N-конца гистоновых хвостов [165, 175].

В норме ацетилирование хвостов гистонов необходимо для активации транскрипции ДНК. Ацетилирование гистонов добавляет отрицательного заряда на их поверхность, что приводит к отталкиванию гистонов друг от друга и уменьшению плотности прилегания к ДНК. В результате высвобождается внешняя поверхность витков ДНК для взаимодействия с регуляторными факторами, и закрытая до этого ДНК становится доступной для молекул, осуществляющих транскрипцию [117].

Степень ацетилирования гистонов связана с активностью двух типов ферментов – гистонацетилтрансфераз (histone acetyl-transferases – НАТ) и деацетилаз (histone deacetylases – HDAC). В норме активаторы транскрипции обладают гистонацетилтрансферазной активностью. И наоборот, репрессоры транскрипции ассоциированы с деацетилазной активностью. Альтерация ацетилаз является причиной угнетения транскрипции из определенных генов, а следовательно, и уменьшения количества определенных белков и уменьшения определенной функции клетки. Было доказано, что молекула этанола активирует

именно деацетилазы, то есть выступает в качестве репрессора транскрипции. Учитывая это, осуществляются попытки лечить алкоголизм путем введения ингибиторов гистондеацетилаз (например, трихостана) [152, 202]. Характерно, что при хроническом алкоголизме экспрессия гена увеличивается [144], но при первоначальном контакте с алкоголем наоборот уменьшается [111, 144]. Показано, что этанол и его метаболит ацетальдегид могут совершенно противоположным образом влиять на баланс «ацетилирования – деацетилирования» тех самых гистонов [99].

В результате нарушения ацетилирования гистонов под влиянием этанола ухудшается процесс транскрипции из соответствующего гена, который «накручен» на этот гистон [101, 117]. Именно в этих генах и закодирована информация о структуре того или иного фермента гликолиза, глюконеогенеза, гликогенеза, гликогенолиза, липогенеза, липолиза, кетогенеза и др. [86, 153, 161, 207, 229]. Таким образом, этанол вызывает эпигенетические изменения, которые приводят к метаболическим дисфункциям [174].

Вторым видом повреждающего воздействия этанола на эпигеномные механизмы регуляции транскрипции является повреждение метилирования цитозина - одного из четырех нуклеотидов ДНК [107]. В норме обратное метилирование ДНК, как и ацетилирование хвостов гистонов, является необходимым условием для экспрессии генов [85]. Причем метилирование одних генов под воздействием этанола усиливается [146, 174], вторых – уменьшается [204], а третьих – и усиливается, и уменьшается, в зависимости от продолжительности алкоголизации, от возраста [95, 130]. Это еще раз подчеркивает многообразие и сложность воздействий этанола на экспрессию генома и на организм в целом, зависимость вида и степени нарушений клеточного метаболизма от срока алкоголизации.

Нарушением эпигенетических механизмов регуляции транскрипции сегодня объясняют почти все негативные изменения в организме, как естественные (возрастные), так и патологические. Например, эпигеномикой объясняют возрастное ухудшение памяти [214], нейродегенеративные и психиатрические

заболевания [120, 216], изменения эмоционального фона и характера [17]. А факторами, провоцирующими определенные изменения эпигенетических механизмов, могут быть любые молекулы. Чаще всего это естественные субстраты тех ферментов, синтез которых регулируется этими механизмами [223]. Развитие алкоголизма из-за нарушений эпигенетических факторов даже не требует начального полиморфизма генов: например, наличия аллели гена, в котором закодирована изоформа АлДГ2 [71], и др [36]. Ведь при этом не происходит мутации, то есть изменения нуклеотидной последовательности в молекуле ДНК: нет транслокации (переноса участка хромосомы на другую), дупликации (повторения участка хромосомы), инверсии (изменения порядка генов в хромосоме на обратный), делеции (утраты участка хромосомы).

Описанные выше эпигенетические изменения могут приводить и к увеличению экспрессии определенных генов, в которых закодирована информация о так называемых микроРНК. МикроРНК-особый класс коротких молекул РНК, которые связываются с матричными РНК (мРНК), тем самым блокируют их, то есть прерывают цепочку «ДНК – мРНК – белок» на последнем этапе. Причем каждая микроРНК может подавлять синтез не одного, а многих белков, за счет своей неполной специфичности – ведь она комплементарна не к одной, а к нескольким последовательностям мРНК. Установлено, что этанол увеличивает экспрессию микроРНК под номером 9 (miR-9) [201]. В результате уменьшается количество белков кальций-зависимых калиевых каналов большой проводимости. Эти каналы поддерживают нервную клетку в состоянии покоя, восстанавливают ее после генерации нервного импульса [169]. За счет этого клетка приобретает толерантность к дальнейшему воздействию этанола – нейроны таким образом ограничивают себя от избытка алкоголя.

Опосредованно через miR-9, этанол также «заглушает» нормальную транскрипцию из таких генов: *hepatocyte nuclear factor 3, 6* (вследствие чего происходит нарушение транскрипции генов в печени); *low-density lipoprotein receptor, apolipoprotein B-100* (в результате нарушается липидный обмен); *troponin T* (в результате развивается алкогольная кардиомиопатия); *eukaryotic translation*

initiation factor 2A (нарушается трансляция белков); glutathione S-transferase (уменьшается антиоксидантная защита); dopamine receptor (нарушается эмоциональное состояние, развиваются депрессии); alcohol dehydrogenase (уменьшается толерантность к этанолу). Кроме того, и другие микроРНК: miRNA-155, miR-497 и miR-302b также находятся под контролем этанола [180, 234].

Итоги аналитического обзора литературы. К нынешнему времени хорошо изучены метаболические повреждения клетки при алкоголизме. Но анализ научной литературы с ретроспективой в 40 лет не выявил исследований, которые бы связывали возникновение влечения к алкоголю с метаболическими нарушениями мозга. Соответственно, и проблема подавления стойкого влечения к алкоголю в таком аспекте не рассматривалась. Поэтому возникла необходимость провести отдельное исследование по выявлению возможных причинно-следственных взаимоотношений.

ГЛАВА 2

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Данное исследование посвящено этиологии патологического влечения к алкоголю. Поэтому, создавая модель эксперимента, мы исходили из общебиологического принципа, что влечение к чему бы то не было, как поведенческая реакция, является отражением внутреннего состояния организма. Поскольку в основе алкогольной болезни лежат метаболические сдвиги (гипогликемия и кетоацидоз), поэтому в нашем исследовании заданными переменными параметрами (управляемыми и контролируруемыми в экспериментах) были уровень гликемии и уровень кетонурии, а главной производной и зависимой от них величиной была добровольно количество потребленного алкоголя в условиях свободного выбора.

Эксперимент проводился в два этапа. На первом этапе моделировали алкогольную зависимость путем длительной принудительной алкоголизации (5, 48, 23). При проведении работы использовали следующие методы: физиологические, биохимические, гистоэнзимологические и статистические. С помощью физиологического метода оценивали питьевой режим животных - регистрировали потребление раствора этанола, глюкозы, воды. Так как животные отличались по весу, перерасчет выпитой жидкости делали на 0,1 кг веса в час или в сутки. Биохимические методы включали: определение концентрации кетоновых тел в моче, концентрации глюкозы в крови.

Гистоэнзимологическим методом определяли активность в тканях головного мозга ЛДГ, Г-6-ФДГ и СДГ.

На втором этапе у 60 экспериментальных и 40 интактных крыс выполняли метаболическую коррекцию, включающую продолжительную (в течение 30 суток) и кратковременную (однократную) углеводную нагрузку, нейтрализацию кетоновых тел, а также сочетанную коррекцию гликемии и кетоза.

Для обработки полученных данных применялся математико-статистический метод с использованием статистических пакетов прикладных программ «Statistica 6.0», «MedStat».

2.1 Условия содержания животных

Эксперименты проведены в осенне-зимний период, при естественном освещении и поддерживаемой температуре в виварии на уровне 17-21°C. Животные содержались по одной особи в клетке, на обычном пищевом рационе для грызунов, при свободном доступе к кормушкам и поилкам. Всего использовали 120 самцов белых лабораторных крыс в возрасте 12 месяцев массой 200-250 г. Использование особей одного пола, массы, возраста продиктовано стремлением свести к минимуму разницу в полученных результатах, обусловленную индивидуальными, половыми, возрастными характеристиками животных. С той же целью максимально стандартизировали условия содержания, не провоцировали избыточного питьевого поведения чрезмерно сухой или соленой пищей. Были соблюдены принципы Хельсинской декларации о гуманном отношении к животным, выполнены требования Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых в исследовательских и других научных целях, и постановления Первого национального конгресса по биоэтике [13].

2.2 Дизайн эксперимента

На протяжении подготовительного этапа (1 неделя) изучали потребление воды, 10 % этанола и 5 % глюкозы здоровыми крысами (все 120 особей). Затем крыс распределили по группам, соответственно этапам эксперимента (таблица 1)

Распределение крыс в ходе выполнения эксперимента

| Характер воздействия | | Исследуемые параметры | |
|---|--|---|----------------------|
| I этап: | II этап: | Количество выпитого алкоголя, воды, глюкозы; уровень гликемии, кетонурии | АВР по глюкозе |
| Предварительная 112-дневная принудительная алкоголизация подопытных крыс n = 60. Из них: | 1а группа, n = 10: 30- дневное усиленное питание | + контроль 1 раз в сутки | + |
| | 2а группа, n = 10: 30- дневное подавление кетоза | + контроль 1 раз в сутки | + |
| | 3а группа, n = 10: 30- дневное усиленное питание и подавление кетоза | + контроль 1 раз в сутки | + |
| | 4а группа, n = 10: 30- дневное введение 0,9 % NaCl | + контроль 1 раз в сутки | + |
| | 5а группа, n = 10: 3-дневное подавление кетоза | + почасовой контроль | - |
| | 6а группа, n = 10: 3-дневное введение 0,9 % NaCl | + почасовой контроль | + |
| контрольные крысы, без алкоголизации и n= 60. Из них: | 1-к группа, n = 10: 30- дневное усиленное питание | + контроль 1 раз в сутки | + |
| | 2к группа, n = 10: 30- дневное подавление кетоза | + контроль 1 раз в сутки | - |

| | | | |
|---|---|---|---|
| | 3к группа, n = 10: 30-дневное усиленное питание и подавление кетоза | + | - |
| | 4к группа, n = 10: 30-дневное введение 0,9 % NaCl | + | - |
| | 5к группа, n = 10: 3-дневное подавление кетоза | + | - |
| | 6к группа, n = 10: 3-дневное введение 0,9 % NaCl | + | + |
| В общей сложности использовано 120 крыс | | | |

Примечания:

-усиленное питание - пер ос вводили 1 мл 40 % крахмала (в пересчете на глюкозу – 2,0 г/кг массы животного);

подавление кетоза – 1,4 % раствор унитиола (Зорекс, «Валента фармацевтика», Россия) из расчета 3,5 мг/кг;

+ проводили измерения параметров,

- не проводили измерения параметров.

2.3 Моделирование принудительной алкоголизации

На I-м этапе эксперимента 60 крыс подвергали принудительной алкоголизации. В клетке у животного находилась только одна поилка: с 10 % раствором этанола. Принудительная алкоголизация длилась 112 суток (16 недель). Доступ к еде был свободным.

Для изучения динамики формирования влечения к алкоголю до начала принудительной алкоголизации, а также в отчетные периоды (21-й день, 42-й день, 84-й день, 112-й день) только на один день в клетку, кроме поилки с 10 % этанолом, помещали еще две дополнительные поилки: поилку с чистой питьевой водой и в поилку с 5% раствором глюкозы. Регистрировали количество выпитого за сутки из каждой поилки, затем поилки с водой и раствором глюкозы забирали

из клетки. Точность измерения – 1 мл (цена деления на шкале поилки для грызунов ТМ «Природа» – 1 мл). Потребление менее 1 мл не учитывалось (расценивалось как случайное – ошиблись поилкой). Поскольку животные отличались между собой в весе, делали перерасчет выпитой жидкости на 0,1 кг тела.

Степень влечения к алкоголю оценивали по количеству добровольно потребляемого 10 % этанола в условиях свободного выбора питья. По количеству выпитой 5 % глюкозы в условиях свободного выбора питья проверяли гедонические свойства глюкозы. Исходили из того, что глюкоза (сладости) является любимым лакомством практически для 100 % млекопитающих по той причине, что в норме это единственный питательный субстрат для клеток мозга. Уровень добровольного потребления глюкозы отражает уровень потребности мозга в этом субстрате.

После проведения принудительной алкоголизации была применена группировка животных с помощью проведения кластерного анализа. Это позволило распределить статистическую совокупность животных на три кластера по уровню потребления 10% этанола в однодневном эксперименте. На рисунке 1 указаны средние значения потребления 10% этанола по каждому кластеру в динамике принудительной алкоголизации. Проведение сравнительного анализа количества выпитого этанола в однодневном эксперименте для каждого кластера и последующий расчет референтных интервалов позволил распределить всех подопытных животных ($n = 60$) на три группы: в 1-ю группу были распределены 12 животных, которые потребляли 7,0 и более мл / 0,1 кг / сутки (сильно пьющие); во 2-ю группу вошли 36 животных, потреблявших этанол на уровне от 6,0 до 7,0 мл / 0,1 кг / сутки (умеренно пьющие); и в 3-ю группу были отнесены 12 крыс, которые потребляли менее 6,0 мл / 0,1 кг / сутки (малопьющие).

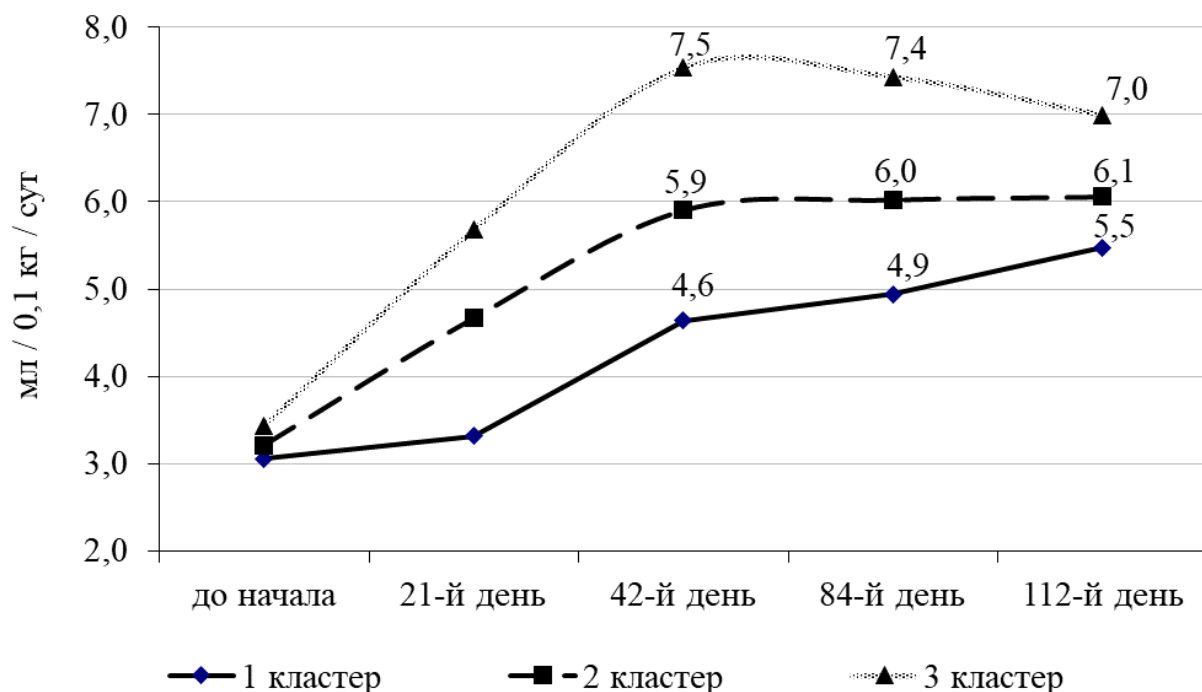


Рисунок 1. Распределение животных по количеству добровольного потребляемого 10% этанола в условиях свободного выбора питья в однодневных экспериментах, выполнявшихся в отчетные периоды принудительной алкоголизации

1-й кластер – малопьющие крысы (менее 6,0 мл/0,1 кг/сутки)

2-й кластер – умеренно пьющие крысы (6,0 до 7,0 мл/0,1 кг/сутки)

3-й кластер – сильно пьющие крысы (7,0 и более мл/0,1 кг/сутки)

Такое распределение было сделано для того, чтобы на II этапе эксперимента все группы животных, где проводились различные виды метаболической коррекции, были в равных условиях, то есть в каждую опытную группу (1а – 6а) вошли и сильно пьющие, и умеренно пьющие, и мало пьющие крысы в одинаковом количестве. В дальнейшем каждая из шести исследовательских групп включала 20 % ($n = 2$) крыс, которые потребляли 7,0 и более мл / 0,1 кг / сутки, 60 % ($n = 6$) крыс, которые потребляли от 6,0 до 7,0 мл / 0,1 кг / сутки), и 20 % ($n = 2$) крыс, которые потребляли менее 6,0 мл / 0,1 кг / сутки. Выбор особей в исследовательские группы проводился по принципам случайной рандомизации.

После окончания принудительной 112-дневной алкоголизации, в ходе различного рода метаболических коррекций, всем 60 животным была предоставлена свобода выбора питья между 10% этанолом, 5% глюкозой и чистой водой.

2.4 Виды метаболической коррекции, выполняемой на II этапе эксперимента

Поскольку первоначально перестройка углеводного метаболизма в алкогользависимом организме провоцируется длительной гипогликемией [5], то дизайн эксперимента базируется на идее от обратного: в подопытной группе 1а моделировалась нормогликемия в течение длительного времени. Достигали этого с помощью усиленного принудительного питания крыс. Для этого животным в течение 30 дней ежедневно 3 раза в сутки, с интервалом в 5 часов (в 8.00, 13.00, 18.00), с помощью шприца Жане вводили per os 1 мл заваренного киселя из 40 % крахмала (в пересчете на глюкозу – это 2,0 г / кг массы животного). Выбор крахмала обусловлен тем, что этот сложный полисахарид с разветвленной цепью в желудочно-кишечном тракте крысы расщепляется довольно долго, образованная глюкоза всасывается постепенно, что обеспечивает поддержание стабильного уровня глюкозы в крови длительное время и не провоцирует перенапряжение инсулярного аппарата поджелудочной железы. Фактически пероральное введение густого киселя из крахмала можно приравнять к усиленному питанию углеводами.

В качестве альтернативного вида коррекции была выбрана метаболическая коррекция унитиолом (группа 2а). Животным этой группы аналогичным образом в те же временные периоды вводили per os 1,4 % раствор унитиола из расчета 3,5 мг/кг. Применяли дозировки, предлагаемые производителем. Объем введения составлял от 0,8 мл до 1,2 мл, в зависимости от массы животного соответственно. В качестве источника унитиола использовали фармпрепарат Зорекс («Валента фармацевтика», Россия). Действующее вещество унитиол относится к группе антидотов, так как способно нейтрализовать кетоновые тела. Унитиол, или

димеркаптопропансульфонат натрия – донатор сульфгидрильных (тиоловых) групп. С помощью двух активных сульфгидрильных групп эта молекула связывается с кислородом С=О- групп кетоновых тел прямо в периферической крови и таким образом их нейтрализует [22].

В группе 3а выполняли сочетанную коррекцию. Так как крахмал вводили вместе с унитиолом, чтобы не увеличивать общий объем введения, вводили 0,5 мл 80 % крахмала и увеличивали концентрацию унитиола (не 1,4 %, а 2,8 %), то есть вводили 0,4 - 0,6 мл 2,8 % раствора унитиола.

Группой сравнения выступали подопытные крысы 4а группы, которым вместо метаболической коррекции таким же образом вводили 1 мл 0,9 % раствора хлорида натрия (NaCl).

С целью отследить влияние уровня кетоза на влечение к алкоголю создавали условия для колебания уровня кетоза в течение суток. Для этого животным подопытной группы 5а вводили суточную дозу унитиола однократно вечером, в 17.00. Чтобы не увеличивать объем введения, использовали 4,2% раствора унитиола. Такой эксперимент длился 3 дня.

2.5 Исследование артериовенозной разницы по глюкозе

Для выяснения степени утилизации глюкозы мозгом определяли концентрацию этой молекулы в артериальной крови, которая была взята из общей сонной артерии (*a. carotis communis*), и в венозной крови, которая была взята из стока синусов мозга (*confluens sinuum*). Для оценки утилизации глюкозы организмом в целом выясняли артериовенозную разницу между артериальной кровью из *a. carotis communis* и венозной кровью из бедренной вены (*v. femoralis*) [28].

Из каждого из указанных сосудов забор крови осуществляли дважды: утром натощак и через 30 минут после моделирования кратковременной гипергликемии.

Кратковременную гипергликемию моделировали в остром эксперименте под тиопенталовым наркозом путем введения в *v. femoralis* 0,33 мл 20 % глюкозы (из расчета 1,65 мл на 0,1 кг массы животного) со скоростью 0,5 мл/мин. Такое

количество глюкозы (0,33 г/кг) соответствует стандартному внутривенному тесту для определения толерантности организма к глюкозе (применяется в клинике). Пользовались анатомическим атласом крысы [28].

Артериовенозную разницу по глюкозе в течение эксперимента изучали в следующих группах: у здоровых крыс без алкоголизации – бк группа; у крыс после принудительной алкоголизации без метаболической коррекции – ба группа; после 30-дневной коррекции гликемии (1а группа), коррекции кетонемии (2а группа), сочетанной коррекции гликемии и кетонемии (3а группа); в группе сравнения, получавшей 30 дней 0,9% NaCl (4а группа). Также артериовенозную разницу по глюкозе определяли в контрольной группе здоровых крыс после 30-дневной коррекции гликемии (1к группа).

Сразу после забора крови из *a. carotis communis*, *cjfluens sinuum*, *v. femoralis* животное выводили из эксперимента путем декапитации под тиопенталовым наркозом, 90 мг / кг

Величина артериовенозной разницы по глюкозе свидетельствует о способности ткани утилизировать глюкозу, что, в свою очередь, зависит от нескольких факторов. Из них два самых главных – это количество глюкозы в крови и состояние клеток (функциональное или патологическое).

Была исследована артериовенозная разница по глюкозе для мозга и организма в целом в условиях гипогликемии, нормогликемии, гипергликемии. Гипогликемия моделировалась длительной алкоголизацией. Нормогликемию восстанавливали длительным усиленным углеводным питанием. Кратковременную гипергликемию воспроизводили с помощью внутривенного введения глюкозы.

На II этапе эксперимента АВР по глюкозе изучали у 70 крыс: 50 алкоголизованных животных (это группы 1а, 2а, 3а, 4а, ба) и 20 контрольных здоровых животных (это группы 1к и бк) (таблица 1).

2.6 Дизайн трехдневного эксперимента для суточного почасового мониторинга кетонурии, гликемии, влечения к алкоголю

В ходе II этапа этот эксперимент выполнялся на 40 крысах. Это 20 алкоголизованных животных (группы 5а и 6а) и 20 – контрольных здоровых животных (это группа 5к и 6к) (таблица 1). Основные условия этого эксперимента представлены в таблице 2. С целью предотвращения путаницы в таблице 2 использована та же самая нумерация групп, что и в таблице 1. На I этапе эксперимента, в течение 112 суток, 20 животных двух опытных групп подвергались принудительной алкоголизации.

Таблица 2

Распределение животных для суточного почасового мониторинга
кетонурии, гликемии, влечения к алкоголю

| Группы крыс | | Условия эксперимента |
|---|--------------------|--|
| Предварительно алкоголизованные 112 суток, n = 20 | 5а группа, n=10 | Три дня подряд введение унитиола путем 1 раз в сутки в 17.00 |
| | 6а группа, n=10 | Три дня подряд введение 1 раз в сутки 0,9% NaCl в 17.00 |
| Контрольные здоровые, n = 20 | 5к группа, n=10 | Три дня подряд подавление кетоновых тел унитиолом путем введения 1 раз в сутки в 17.00 |
| | 6к группа, n=10 | Три дня подряд введение 1 раз в сутки 0,9% NaCl в 17.00 |

А 20 животных контрольной группы все это время содержались на обычном питьевом и пищевом рационе для грызунов.

На I этапе эксперимента, в течение 112 суток, 20 животных двух опытных групп подвергались принудительной алкоголизации. А 20 животных контрольной группы все это время содержались на обычном питьевом и пищевом рационе для грызунов.

II этап эксперимента длился 3 суток, в течение которых каждый вечер, в 17.00, у крыс каждой групп сначала определяли количество кетоновых тел в моче, глюкозы в крови, регистрировали количество выпиваемых растворов в условиях

свободного выбора, а потом животным подопытной группы 5а и контрольной группы 5к перорально вводили 2,8 % раствор унитиола из расчета суточной дозировки, рекомендованной производителем. А животным попытной группы 6а и контрольной группы 6к – в том же объеме вводили 0,9 % NaCl. Затем из клеток животных на ночь убирали поилки с этанолом, но помещали поилки с чистой питьевой водой.

На следующий день, утром, в 9.00 ч, у крыс сначала снова определяли степень кетонурии, уровень гликемии, количество выпитой воды, а затем алкоголизированным возвращали в клетки поилки с этанолом. При этом поилки с чистой водой тоже оставались в клетке, то есть животным в течение дня была предоставлена свобода выбора питья между чистой водой и 10% раствором этанола. Степень кетонурии и количество выпитого алкоголя регистрировали каждый час: в 9.00, 10.00, 11.00, 12.00, 13.00, 14.00 15.00, 16.00, 17.00 часов. А почасовую регистрацию степени гликемии проводили только в последний – третий – день эксперимента, перед выведением животных из эксперимента.

2.7 Биохимические и гистоэнзимологические методы

У животных до начала и в ходе эксперимента биохимическим глюкозооксидазным методом с фотометрической регистрацией по конечной точке определяли уровень глюкозы в сыворотке крови (20). У каждого животного подопытных групп 1а - 4а кровь брали 8 раз: до начала эксперимента; затем в 21, 42, 84, 112 дня принудительной алкоголизации; затем в 10, 20, 30 дни метаболической коррекции. Взятие крови осуществляли утром, с 8.00 до 9.00. Чтобы животные были в состоянии натошак, накануне вечером из клеток забирали кормушки. Для выяснения текущего уровня гликемии взятие капли крови осуществляли из хвостовой вены. У животных контрольных групп 1к – 4к измеряли уровень гликемии 4 раза: до начала эксперимента, в 10-й, 20-й, 30-й дни метаболической коррекции.

Для выяснения степени утилизации глюкозы тканями мозга и всего организма в целом определяли уровень гликемии после забора крови из разных сосудов в остром эксперименте, под тиопенталовым наркозом.

В трехдневном эксперименте, где отслеживали суточную динамику колебания гликемии, взятие капли крови из хвостовой вены проводили до эксперимента, а затем в течение третьего дня эксперимента с 9.00 до 17.00: в 8.00, 9.00, 10.00, 11.00, 12.00, 13.00, 14.00, 15.00, 16.00, 17.00.

Для определения кетоновых тел в моче были использованы тест-полоски Citolab («Фармаско», Украина), принцип действия которых основан на реакции Легала (22, 37). На бумагу тест-полосок нанесен нитропруссид натрия, при взаимодействии с которым кетоновые тела дают красно-фиолетовую окраску. Интенсивность окраски меняется в зависимости от концентрации кетоновых тел. Для оценки результатов использовали шкалу, предлагаемую производителем:

«-» – нет кетонов;

"±"- концентрация кетонов до 5 мг / дл (до 0,5 ммоль / л);

«+» – концентрация кетонов 6-15 мг/дл (0,6-1,5 ммоль/л);

«++» – концентрация кетонов 16-40 мг/дл (1,6-4,0 ммоль/л);

«+++» – концентрация кетонов 41-100 мг/дл (4,1-10 ммоль/л).

Сбор мочи осуществляли утром, с 8.00 до 9.00. Чтобы животные были в состоянии натощак, накануне вечером из клеток забирали кормушки. Для сбора мочи крысу на несколько минут высаживали в пластиковый контейнер с перфорированным дном. Моча стекала в поддон. Хотя у интактной крысы частота микций 1-2 в час [44], но оказавшись в стрессовой ситуации, в непривычной среде (в контейнере), крыса, как правило, уринирует практически сразу – в течение 2-3 минут.

Содержание кетоновых тел в моче каждой крысы в течение эксперимента определяли 8 раз: до начала эксперимента; затем в 21-й, 42-й, 84-й, 112-й день принудительной алкоголизации; затем на 10-й, 20-й, 30-й день любой метаболической коррекции (крахмалом и/или унитиолом). В краткосрочном эксперименте, в котором отслеживали суточную динамику колебания кетонурии,

сбор мочи проводили в течение трех дней с 9.00 до 17.00: в 8.00, 9.00, 10.00, 11.00, 12.00, 13.00, 14.00, 15.00, 16.00, 17.00.

2.8 Контрольные группы здоровых крыс

Для изучения особенностей углеводного метаболизма у здоровых животных, а также исключения возможного патогенного воздействия усиленного углеводного питания или раствора унитиола на организм здоровых животных, были введены группы контроля ($n = 60$). Они также были поделены на 6 групп, по 10 животных в каждой. В таблице 1 это группы 1к – 6к контрольных животных. Здоровых крыс 1к группы в течение 30 дней принудительно кормили концентрированным крахмальным киселем из 40 % крахмала; крысам 2к группы в течение 30 дней вводили *per os* 1,4 % раствор унитиола; крысам 3к группы проводили сочетанную коррекцию 80 % раствором крахмала и 2,8 % унитиола из расчета 3,5 мг / кг; 4к группе животных вводили изотонический раствор хлорида натрия. Количество потребляемого питья регистрировали ежедневно, а замеры уровня гликемии, кетонурии – до начала эксперимента, а затем через одну, две, три декады любой алиментарной коррекции.

В группе 5к трижды один раз в сутки в 17.00 здоровым животным вводили суточную дозу унитиола и контролировали, как это повлияет на питьевой режим и изучаемые биохимические показатели в течение последующих суток. Группа 6к служила контролем здоровых животных без метаболической коррекции.

2.9 Математические методы статистического анализа

На каждом этапе исследования математическая обработка данных проводилась с использованием соответствующих методов обработки экспериментальных данных с применением статистических пакетов прикладных программ «Statistica 6.0» [48], «MedStat» [31], «MedCalc 11.6» [10], которые включают в себя все алгоритмы многомерного статистического анализа, параметрических и непараметрических сравнений статистических совокупностей.

Построение и анализ математических моделей осуществлялся в пакетах «Statistica 6.0 " и " MedCalc 11.6» [37, 48, 179].

Для математической обработки и анализа результатов исследований были применены базовые методы математической статистики: описательная статистика, критерии четных и множественных сравнений. При этом, обязательным первым этапом обработки результатов была проверка отличия закона распределения случайных величин, которые изучаются, от нормального путем утверждения или отбрасывания нулевой гипотезы по критерию Шапиро-Уилка (в случае малых выборок $n < 30$) или Хи-квадрат (в случае объема выборок $n > 30$) [20]. При сравнении значений использовались параметрические (критерий Стьюденту и Фишеру) или непараметрические (W-критерий Уилкоксона и Хи-квадрат Пирсона) критерии. При сравнении трех и более групп обычно были использованы методы однофакторного анализа Крускала–Уоллиса и множественных сравнений [48]: метод Шеффе (в случае нормального закона распределения); метод множественных сравнений Дана (в случае отличия закона распределения от нормального), при проведении сравнения с контрольной группой использовался критерий Даннета, в некоторых случаях – метод повторных измерений Фридмана. При анализе таблиц сопряженности ($k \times m$) использовался критерий Хи-квадрат Пирсона.

Для анализа связи между признаками использовались методы корреляционного анализа (рассчитывались показатели корреляции Пирсона и ранговой корреляции Спирмена) [20, 48].

Для разбиения множества исследуемых объектов по ряду факторных признаков на однородные группы был применен кластерный анализ с использованием дивизионного метода k-средних (k-means clustering) [48].

ГЛАВА 3

ОЦЕНКА ВЛИЯНИЯ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ПРИНУДИТЕЛЬНОЙ АЛКОГОЛИЗАЦИИ НА ФОРМИРОВАНИЕ ВЛЕЧЕНИЯ К ЭТАНОЛУ, УРОВЕНЬ ГЛИКЕМИИ, КЕТОНУРИИ И ГЕДОНИИ У КРЫС

Согласно основной концепции данной работы, которая заключается в исследовании возможной связи между состоянием углеводного метаболизма и патологическим влечением к алкоголю, на первом этапе было необходимо решить такие задачи: во-первых, получить группы алкоголизованных животных; во-вторых, изучить у них константы гомеостаза, которые отражают состояние углеводного метаболизма: гликемию, кетонурию и гедонию; в-третьих, исследовать корреляцию между динамикой этих констант в ходе принудительной алкоголизации и степенью влечения к алкоголю. Изучение этих вопросов дает возможность проверить гипотезу о зависимости влечения, как формы поведения, от метаболического состояния организма.

Для этого принудительной алкоголизации подвергались 60 крыс. В клетке у животного находилась только одна поилка: с 10 % раствором этанола. Принудительная алкоголизация длилась 112 суток. Каждый день фиксировали количество потребляемого этанола.

Для изучения динамики формирования влечения к алкоголю на различных сроках принудительной алкоголизации (до начала эксперимента, а затем в 21 день, 42 день 84 день 112 день эксперимента), лишь на один день в клетку, кроме поилки с 10 % этанолом, дополнительно помещали еще и поилки с чистой питьевой водой и 5% раствором глюкозы. Степень влечения к алкоголю оценивали по количеству добровольно потребляемого 10 % этанола в условиях свободного выбора питья из этих трех поилок.

Для выяснения текущего уровня гликемии взятие капли крови осуществляли из хвостовой вены. У каждого животного кровь брали 8 раз: до

начала эксперимента; затем в 21, 42, 84, 112 дни принудительной алкоголизации. Кетоновые тела определяли в моче.

3.1 Изменение уровня гликемии в процессе принудительной алкоголизации

До начала эксперимента определяли уровень глюкозы в крови хвостовой вены здоровых крыс, отобранных для эксперимента ($n = 60$), он составлял в среднем $7,01 \pm 0,17$ (95 % ДИ: 6,67-7,34) ммоль/л.

В ходе принудительной алкоголизации в течение 112 суток в опытной группе было зарегистрировано статистически значимое постепенное снижение концентрации глюкозы в крови до $3,00 \pm 0,13$ (95 % ДИ: 2,75-3,26) ммоль/л ($p < 0,05$) (рисунок 2)

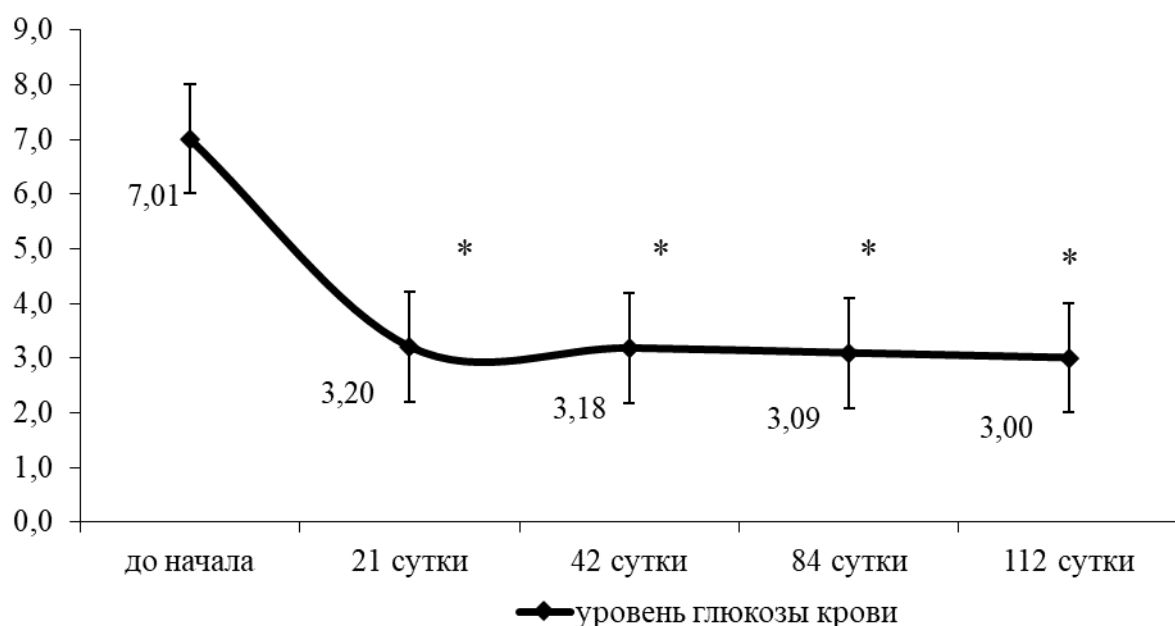


Рисунок 2. Динамика содержания глюкозы в плазме крови крыс подопытных 1а-6а групп ($n=60$) в однодневном эксперименте до начала и в разные сроки принудительной алкоголизации (ммоль/л)

* – статистически значимые различия, по сравнению с показателями предыдущего контрольного периода, $p < 0,05$

Такой результат бы предсказуем, ведь гипогликемия – обязательный компонент хронической алкогольной болезни [54, 154, 196].

Таким образом, в эксперименте принудительная алкоголизация в течение 112 суток приводила к стабильной гипогликемии (Приложение 5, таблица 5.1).

3.2 Изменение уровня гедонии и потребления воды в процессе принудительной алкоголизации

До начала эксперимента крысы ($n = 60$) в сутки выпивали около $3,80 \pm 0,05$ (95 % ДИ: 3,70-3,90) мл / 0,1 кг общего веса жидкости, из которых $2,33 \pm 0,03$ (95 % ДИ: 2,26-2,40) мл, то есть $61,32 \pm 4,87$ %, приходилось на потребление воды (таблица 3.2). Разброс между минимальным и максимальным потреблением воды в разные дни для каждой особи составил не более 2,5 мл на 100 г веса, что свидетельствует о стабильной питьевую поведение, определенную сбалансированным пищевым рационом. Одинаковом потреблению воды способствовало и то, что крысы были примерно одинаковой массы $254,60 \pm 3,99$ (95% ДИ: 246,60-262,50) г и возраста, следовательно соотношение различных тканей в организме было одинаковым (таблица 3).

Таблица 3

Питьевое поведение подопытных крыс ($n = 60$) в условиях свободного выбора до начала эксперимента

| Количество выпитой жидкости: $M \pm m$ (95 % ДИ), мл / 0,1 кг / сут | | |
|---|-----------------------------|-----------------------------|
| воды, $n = 60$ | 5 % глюкозы, $n = 60$ | всего жидкости, $n = 60$ |
| $2,33 \pm 0,03$ (2,26-2,40) | $1,48 \pm 0,03$ (1,41-1,55) | $3,80 \pm 0,05$ (3,70-3,90) |

Кроме того, животные в начале выпивали по $1,48 \pm 0,03$ (95 % ДИ: 1,41 - 1,55) мл / 0,1 кг веса раствора глюкозы. Следует подчеркнуть, что раствор глюкозы животные потребляли при наличии избытка чистой воды в клетке. Это свидетельствует о гедонических свойствах глюкозы.

На втором этапе, во время принудительной алкоголизации потребление воды постепенно уменьшалось (по результатам односуточных измерений по окончании третьей, шестой, двенадцатой и шестнадцатой недель): с $2,33 \pm 0,03$ (95 % ДИ: 2,26-2,40) мл / 0,1 кг / сут до $0,42 \pm 0,03$ (95 % ДИ: 0,36-0,48 мл) / 0,1 кг (Приложение 6, таблица 6.1). Это стало неожиданным явлением, ведь хорошо известно о повышенной жажде вследствие осмотической активности молекул этанола.

Наблюдения за потреблением глюкозы во время принудительной алкоголизации показали (рисунок 3), что у алкогользависимых крыс глюкоза постепенно теряет свои гедонические свойства.

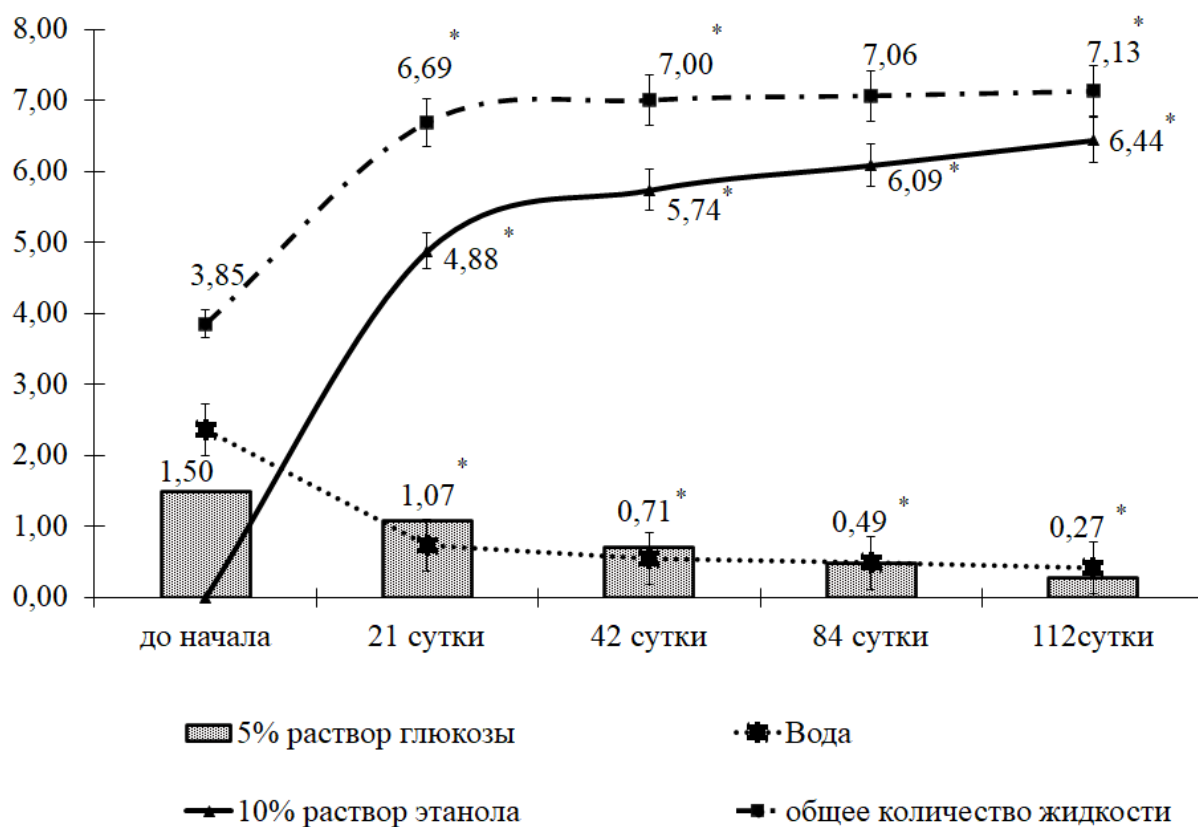


Рисунок 3. Динамика уровня потребления жидкостей (воды, 5 % раствора глюкозы, 10% раствора этанола) крысами опытной группы в период принудительной алкоголизации (мл / 0,1 кг / сут)

* — статистически значимые различия, по сравнению с показателями предыдущего контрольного периода, $p < 0,05$

Вывод сделан на основании того, что у этих животных уменьшается предпочтение раствора глюкозы в условиях свободного выбора, по сравнению со здоровыми особями. Отмечена прямая сильная корреляционная связь между уровнем потребления этанола конце 16 недели принудительной алкоголизации и снижением потребления раствора глюкозы в однодневном эксперименте ($r_p = 0,86$ при $p < 0,05$). Эти наблюдения согласуются с данными других исследователей, которые показали, что у крыс со сформированной зависимостью не уменьшается предпочтение алкоголя даже при возможности свободного выбора между алкоголем с добавлением горького хинина и подслащенной сахаром обычной питьевой водой [222]. В ходе эксперимента было отмечено, что длительность алкоголизации, а следовательно, и степень зависимости, влияет на количество употребляемой глюкозы: чем дольше алкоголизация (3 – 6 – 12 – 16 недель), тем меньше крысы потребляли глюкозы в условиях свободного выбора. Из рисунка 3 видно, что при сравнении показателей питьевого режима по глюкозе от одного отчетного периода к другому, статистически значимо снижается уровень ее потребления с $1,50 \pm 0,08$ (95 % ДИ: 1,34-1,65) мл / 0,1 кг / сут до начала эксперимента до $0,27 \pm 0,03$ (95 % ДИ: 0,23-0,34) мл / 0,1 кг / сутки на 16-й неделе ($p < 0,05$).

В конце 16 недели алкоголизации потребление 5% раствора глюкозы в условиях свободного выбора в среднем было на $82,0 \pm 3,84\%$ ниже, чем у здоровых крыс ($p < 0,05$). Организм в целом и мозг в частности, попав в ситуацию хронического недостатка «топливного» субстрата – глюкозы – должен был активно продуцировать поведенческую реакцию, направленную на поиск и прием углеводной пищи, но не отказываться от предлагаемой глюкозы добровольно.

Таким образом, длительная принудительная алкоголизация приводит к уменьшению потребления воды и потере гедонических свойств глюкозы, даже в условиях свободного выбора.

3.3 Динамика формирования влечения к алкоголю в процессе принудительной алкоголизации

Принудительной алкоголизации в течение 112 суток (16 недель) подвергли 60 крыс групп 1а – 6а. В клетке у животного находилась только одна поилка: с 10 % раствором этанола. Динамика потребления 10 % этанола крысами опытной группы в период принудительной алкоголизации представлена на рисунке 4.

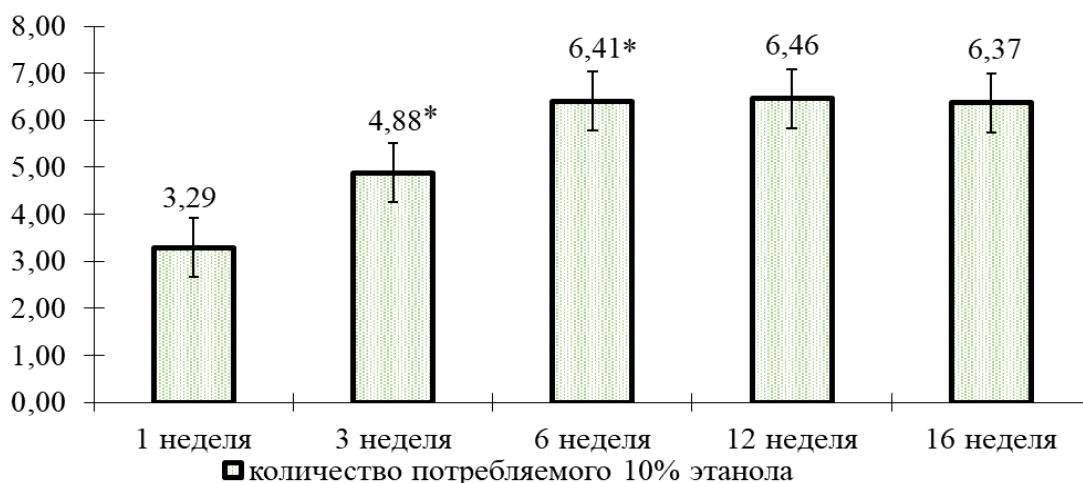


Рисунок 4. Динамика уровня потребления 10% раствора этанола крысами опытной группы в контрольные периоды принудительной алкоголизации (мл/0,1 кг/сут)

* – статистически значимые различия, по сравнению с показателями предыдущего контрольного периода, $p < 0,05$

Потребление этанола в ходе принудительной алкоголизации было следующим. В течение первой недели алкоголизации животные выпивали в среднем по $3,29 \pm 0,06$ (95% ДИ: 3,16-3,41) мл / 0,1 кг / сут 10 % раствора этанола.

Дальнейший анализ питьевого режима крыс, данные по которому подробно представлены в таблице 10.1 в приложении 10, позволил предположить, что при развитии алкогольной зависимости изменения в метаболизме клеток накапливаются нелинейно, с разной скоростью. Первые изменения происходят уже в период между первой и третьей неделями алкоголизации (рисунок 4). На

это указывают изменения уровня потребления этанола, которые были отмечены именно в эти временные периоды.

При проведении сравнения средних показателей питьевого режима на конец первой недели ($3,29 \pm 0,06$ (95 % ДИ: 3,16-3,41) мл / 0,1 кг / сут) и третьей недели ($4,88 \pm 0,15$ (95 % ДИ: 4,57-5,18) мл / 0,1 кг / сут) установлено статистически значимое ($p < 0,05$) повышение количества выпитого этанола в 1,48 раза, что может свидетельствовать о привыкании крыс к горькому вкусу питья.

К концу шестой недели произошло еще одно повышение потребления 10 % раствора этанола – до $6,41 \pm 0,17$ (95 % ДИ: 6,07-6,74) мл / 0,1 кг / сут ($p < 0,05$). В среднем значения количества выпитого, по сравнению с показателями на третьей неделе, выросли в 1,3 раза ($p < 0,05$). В последующие периоды с 12-й по 16-ю неделю потребление этанола стабилизировалось на уровне от $6,46 \pm 0,15$ (95 % ДИ: 6,16-6,76) мл / 0,1 кг / сут до $6,37 \pm 0,14$ (95 % ДИ: 6,10-6,65) мл / 0,1 кг / сут, соответственно ($p > 0,05$).

Таким образом, наблюдалось статистически значимое увеличение объема выпитого алкоголя от первого отчетного периода до последнего. В ходе эксперимента было отмечено, что потребление алкоголя с шестой недели было своего рода «потолком» потребления, поскольку в дальнейшем, до шестнадцатой недели, несмотря на продолжающуюся принудительную алкоголизацию, это количество оставалось для каждой особи примерно на постоянном уровне, с небольшими флуктуациями. Стабильность потребления этанола с шестой по шестнадцатую неделю свидетельствует о сложившейся алкогольной зависимости (изменение показателей по сравнению с шестой неделей не является статистически значимым ($p > 0,05$)).

Проведение корреляционного анализа уровня потребления этанола и уровня гликемии в период с третьей по 16 неделю при проведении принудительной алкоголизации показало сильную обратную связь между этими показателями ($r_p = -0,94$ на третьей неделе и $r_p = -0,56$ на 16 неделе при $p < 0,01$).

Обращает на себя внимание факт временного формирования «потолка» потребления – конец шестой недели. С нашей точки зрения, это может быть обоснованием минимального времени принудительной алкоголизации.

Выше изложены главные итоги изменения питьевого поведения крыс в ходе эксперимента. Кроме того, можно отметить ряд деталей, которые, хотя и не добавляют принципиально нового в общую сложившуюся картину, но интересны сами по себе и дают материал для размышлений. Так, на втором этапе, в ходе принудительной алкоголизации, общее суточное потребление питья (по результатам однодневных измерений в конце третьей, шестой, двенадцатой и шестнадцатой недель) по сравнению со здоровыми крысами, увеличивалось и в конце 16 недели превысило показатели здоровых животных в 1,8 раза (рисунок 3).

Но при этом характерно, что суточный прирост общего объема питья происходил не за счет глюкозы и воды (их потребление, наоборот, постепенно уменьшалось), а за счет исключительно алкоголя (рисунок 5).

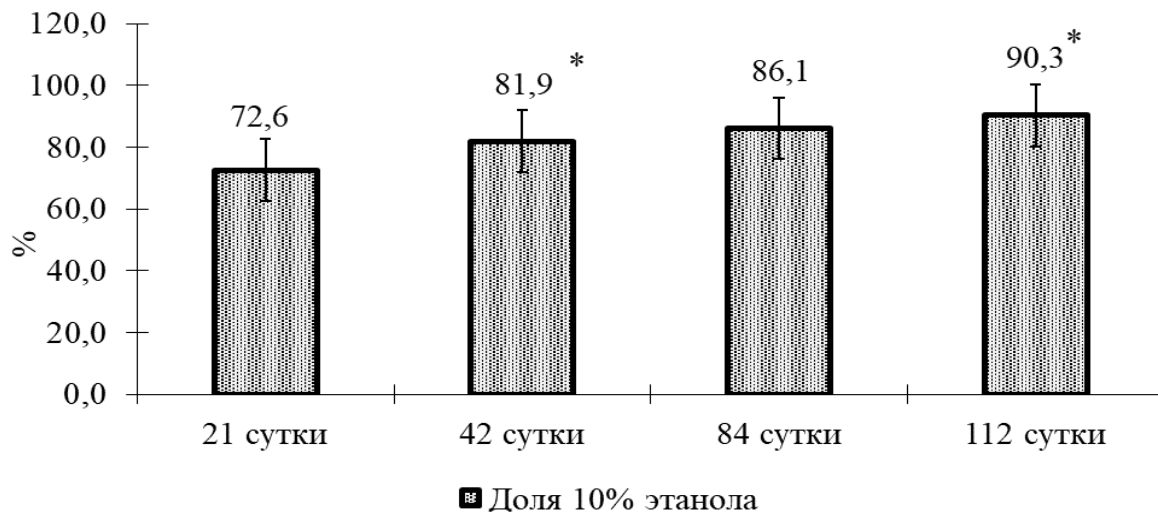


Рисунок 5. Удельный вес 10% раствора этанола в общем количестве жидкости, употребляемой в условиях свободного выбора, в однодневных экспериментах в разные периоды принудительной алкоголизации

* – статистически значимые различия, по сравнению с показателями предыдущего контрольного периода, $p < 0,05$

Повышенная жажда могла быть обусловлена осмотическими свойствами этанола и его метаболита – ацетальдегида.

С учетом проведенного статистического метода расчета референтных интервалов и сравнительного анализа количества выпитого этанола в однодневном эксперименте каждой крысой, подопытных животных, которые подлежали принудительной алкоголизации ($n = 60$), разделили на три группы: 1 группа – это животные, которые потребляли 7,0 и более мл / 0,1 кг / сут ($n = 12$), 2 группа – потреблявшие этанол на уровне от 6,0 до 7,0 мл / 0,1 кг / сут ($n = 36$), 3 группа – это крысы, которые потребляли менее 6,0 мл / 0,1 кг / сут ($n = 12$).

Во II этапе эксперимента участвовали сформированные подопытные группы (1а - 6а), каждая из которых состояла из 20 % крыс, потреблявших 7,0 и более мл / 0,1 кг / сут, 60 % крыс, которые потребляли от 6,0 до 7,0 мл / 0,1 кг / сут, и 20 % крыс, которые потребляли менее 6,0 мл / 0,1 кг / сутки.

3.4 Динамика формирования кетонурии в процессе принудительной алкоголизации

До начала принудительной алкоголизации у здоровых животных кетоновых тел в моче обнаружено не было. После окончания принудительной алкоголизации (через 112 суток) у всех 60 подопытных крыс регистрировалась кетонурия различной степени выраженности.

Наибольшая доля (63,3 %) крыс имели третью степень кетонурии (1,6-3,9 ммоль/л) (рисунок 6) . У 18,3% животных была выявлена самая высокая, четвертая, степень кетонурии (4,0-10 ммоль/л). У 18,4 % подопытных животных уровень кетонурии был ниже 1,5 ммоль/л. Не было выявлено ни одного животного с нулевым уровнем кетонурии.

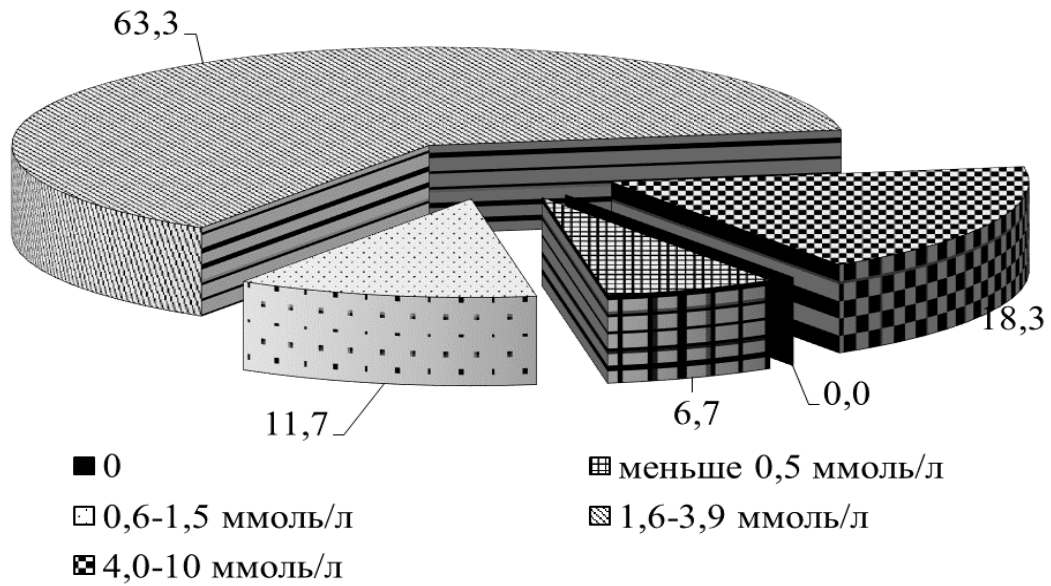


Рисунок 6. Распределение животных с различным уровнем кетонурии в подопытных группах 1а-6а после принудительной алкоголизации (n=60)

Проведение корреляционного анализа зависимости уровня потребления 10% раствора этанола и выраженности кетонурии по окончании принудительной алкоголизации показало прямую сильную связь между этими показателями ($r_s = 0,85$, при $p < 0,05$).

Анализ динамики развития кетонурии показал зависимость степени кетонурии от срока принудительной алкоголизации (Приложение 5, таблица 5.2 в). Подобно динамике потребления этанола, в разные периоды алкоголизации, отмечался постепенный рост степени кетонурии с первой по шестую неделю алкоголизации, по сравнению со здоровыми крысами ($p < 0,01$). Так, до алкоголизации в моче всех 60 подопытных крыс не было кетонов, в конце первой и третьей недель алкоголизации большинство крыс имело уровень кетонурии до 0,5 ммоль/л. В конце шестой и к концу 16 недели отрицательная динамика приостановилась, большинство крыс имели выраженную кетонурию (1,6-3,9 ммоль/л). При сравнении распределения степеней кетонурии в конце шестого и 16 недель статистически значимых различий выявлено не было ($p > 0,05$). Проведение корреляционного анализа показало сильную прямую зависимость выраженности кетонурии с уровнем потребления 10% этанола ($r_s = 0,74$ при

$p < 0,05$) и сильную обратную связь с уровнем гликемии ($r_s = -0,87$ при $p < 0,05$) и уровнем потребления 5 % глюкозы в условиях свободного выбора ($r_s = 0,93$ при $p < 0,05$).

Обращает на себя внимание потеря гедонических свойств глюкозы у алкоголизованных крыс: животные со сложившейся алкогольной зависимостью отказываются от глюкозы, предлагаемой в пище, несмотря на выраженную гипогликемию. Аналогичные результаты получили и другие авторы, которые показали, что гедоническим этот стимул является только для здоровых животных или на ранних этапах формирования алкогольной зависимости, но не на стадии уже сформированной зависимости. Алкогользависимым крысам предоставляли свободный выбор между двумя видами питья: этанолом с добавлением хинина и водой, подслащенной сахаром. Животные выбирали этанол с хинином [222]. Авторы объясняют это так: наличие или отсутствие гедонических свойств глюкозы зависит от уровня функциональной активности системы вознаграждения мозга.

Почему же у алкоголизованных крыс снижается гедония к глюкозе? Ведь известно, что в норме сладости являются любимым лакомством практически для 100 % млекопитающих по той причине, что глюкоза – это единственный питательный субстрат для нейронов мозга. Одним из объяснений может быть снижение функциональной активности ферментов гликолиза, а значит потеря способности утилизировать глюкозу. Ведь, согласно общебиологическому принципу регуляции с помощью негативных обратных связей, уменьшение количества субстрата неизбежно влечет за собой постепенное уменьшение количества и активности ферментов, влияющих на этот субстрат.

За счет чего живет мозг при этих условиях? Известно, что при хроническом дефиците глюкозы метаболизм нейронов перестраивается на синтез макроэргов путем окисления кетоновых тел [154]. Иллюстрацией этого положения могут быть и полученные в этой главе данные о постепенном росте кетоза в ходе принудительной алкоголизации.

3.5 Изменение способности тканей мозга утилизировать глюкозу в результате принудительной алкоголизации

Так как гедония обусловлена исключительно состоянием мозга, назрела потребность в рамках данной работы провести детальное исследование способности усваивать глюкозу алкогользависимым мозгом в частности, а для сравнения – и организмом в целом.

Для этого определялась артериовенозная разница по глюкозе в артериальной крови, притекающей к мозгу, и в венозной крови, которая оттекает от мозга; а также в венозной крови, оттекающей от задних конечностей. Для определения резервных возможностей углеводного обмена кратковременную гипергликемию создавали путем внутривенной глюкозной нагрузки.

У здоровых животных контрольной группы бк ($n = 10$) уровень глюкозы натощак в артериальной крови колебался в пределах от 6,5 до 8,3 ммоль / л, составляя в среднем $7,5 \pm 0,6$ ммоль / л, то есть соответствовал нормогликемии. В венозной крови уровень глюкозы был ниже: в *confluens sinuum* $6,8 \pm 0,6$ ммоль / л, а у *v. femoralis* $7,0 \pm 0,6$ ммоль / л. Таким образом, артериовенозная разница по глюкозе для мозга варьировала в пределах 0,5-0,8 ммоль / л, а для всего организма в целом – в пределах 0,3-0,6 ммоль / л. При сравнении значений артериовенозной разницы по глюкозе для мозга и для всего организма были обнаружены статистически значимые различия, $p < 0,001$. Для каждого отдельно взятого животного разница в утилизации глюкозы мозгом и организмом в целом составляла 0,1-0,3 ммоль / л. Из этого можно сделать вывод, что мозг потребляет глюкозу активнее, чем другие ткани.

Чтобы исследовать резервные возможности углеводного обмена, крысам группы бк внутривенно вводился раствор глюкозы. Это привело к повышению концентрации глюкозы в артериальной крови до $9,1 \pm 0,8$ ммоль / л ($p < 0,01$). Соответственно, и в венозной крови также наблюдалось повышение: в *confluens sinuum* до $8,3 \pm 0,8$ ммоль / л ($p < 0,01$), а в *v. femoralis* до $8,2 \pm 0,8$ ммоль / л ($p < 0,01$). Таким образом, после глюкозной нагрузки у здоровых животных контрольной группы артериовенозная разница для мозга статистически значимо

($p < 0,001$) выросла, в среднем на $0,1$ ммоль / л, по сравнению с пробами натощак, и составила $0,8 \pm 0,1$ ммоль / л (таблица 4).

Таблица 4

Способность тканей головного мозга и тканей организма в целом усваивать глюкозу

| Группа | Условия взятия крови | Концентрация глюкозы в крови разных сосудов, ммоль/л | | | АВР по глюкозе, ммоль/л | |
|--------------------------|----------------------------|---|-----------------------------------|---------------------------|----------------------------|---------------------|
| | | <i>Arteria carotis communis</i> | <i>Conflu- ens sinuum</i> | <i>Vena femoralis</i> | Мозга | Общая |
| Здоровые, бк (n = 10) | Натощак | $7,5 \pm 0,6$ | $6,8 \pm 0,6$ | $7,0 \pm 0,6$ | $0,7 \pm 0,1$ | $0,5 \pm 0,1^*$ |
| | Глюкозная нагрузка | $9,1 \pm 0,8^\#$ | $8,3 \pm 0,8^\#$ | $8,2 \pm 0,8^\#$ | $0,8 \pm 0,1^\#$ | $0,9 \pm 0,1^{\#*}$ |

Примечания: * – статистически значимые различия по сравнению с показателями АВР по глюкозе для головного мозга, $p < 0,01$;

– статистически значимые различия показателей до и после глюкозной нагрузки внутри одной группы, $p < 0,001$.

Увеличение артериовенозной разницы по глюкозе для мозга в условиях гипергликемии наблюдали и другие авторы [16].

Из таблицы 4 видно, что усвоение глюкозы организмом в целом в результате глюкозной нагрузки осуществилось в большей степени, чем усвоение глюкозы мозгом. А именно: артериовенозная разница для организма возросла, по сравнению с пробами натощак с $0,5 \pm 0,1$ ммоль / л до $0,9 \pm 0,1$ ммоль / л ($p < 0,001$), то есть в среднем показатели увеличились на $0,4$ ммоль / л и находились в пределах $0,8-1,0$ ммоль / л. Иными словами, теперь мозг потреблял глюкозу в меньшей степени, чем организм в целом, что является парадоксальным.

Моделирование кратковременной гипергликемии дало возможность оценить способность мозга и других тканей утилизировать избыток энергетического субстрата в условиях физиологического покоя.

Очевидно, что более полная утилизация глюкозы организмом в целом происходила под действием выброса инсулина, спровоцированного глюкозной нагрузкой. Известно, что инсулин в 20 раз повышает транспорт молекул глюкозы через мембрану внутрь клеток благодаря активации транспортеров для глюкозы. Но инсулин оказывает свое действие только на клетки, на мембранах которых есть инсулиновые рецепторы: это мышцы, печени и жировая ткань (в этих тканях избыток глюкозы или депонируется в виде гликогена, или трансформируется в жирные кислоты); и совершенно не влияет на клетки мозга. Вероятно, поэтому артериовенозная разница для мозга увеличилась в меньшей степени: лишь на 0,1 ммоль / л. А причина этого прироста – простое увеличение градиента концентрации глюкозы между кровью и мозгом. Надо уточнить, что хотя инсулиновые рецепторы в мозге найдены, но параллельно исследователи констатируют, что мозг «не откликается» на изменения уровня инсулина. То есть вопрос роли инсулиновых рецепторов и инсулина для мозга на сегодняшний день еще до конца не выяснили, поэтому мозг, как и некоторые другие ткани, традиционно считают инсулинонезависимым.

У предварительно алкоголизованных животных экспериментальной группы ба ($n = 10$) натошак наблюдалась стабильная гипогликемия, по сравнению с показателями здоровых животных контрольной группы бк ($p < 0,001$): в *a. carotis communis* – $3,4 \pm 0,3$ ммоль / л; в *confluens sinuum* – $3,2 \pm 0,3$ ммоль / л; у *v. femoralis* – $3,0 \pm 0,4$ ммоль / л.

Степень гипогликемии была более выражена у животных с высоким уровнем потребления этанола (7,0 и более мл / 0,1 кг / сут) и наименее выражена у животных с низким уровнем потребления этанола (менее 6,0 мл / 0,1 кг / сут). Также зафиксировано снижение артериовенозной разницы по глюкозе, по сравнению со значениями здоровых крыс контрольной группы бк: для мозга – до $0,2 \pm 0,1$ ммоль / л ($p < 0,001$), и для всего организма в целом – до $0,4 \pm 0,1$ ммоль / л ($p < 0,001$) (таблица 5). Отсюда видно, что алкоголизованный мозг потребляет глюкозы не просто меньше, чем здоровый мозг, но даже меньше, чем другие

ткани. Это указывает на тот факт, что в мозге под влиянием алкогольной гипогликемии происходят глубокие и кардинальные перестройки метаболизма.

Таблица 5

Влияние алкоголизации на способность тканей головного мозга и организма усваивать глюкозу из крови

| Группа | Условия взятия крови | Концентрация глюкозы в крови разных сосудов, ммоль/л | | | АВР по глюкозе, ммоль/л | |
|---|----------------------------|---|-----------------------------------|---------------------------|----------------------------|-----------------------|
| | | <i>Arteria carotis communis</i> | <i>Conflu- ens sinuum</i> | <i>Vena femoralis</i> | Мозга | Общая |
| Здоровые, 6к (n = 10) | Натошак | 7,5±0,6 | 6,8±0,6 | 7,0±0,6 | 0,7±0,1 | 0,5±0,1 |
| | Глюкозная нагрузка | 9,1±0,8 [#] | 8,3±0,8 [#] | 8,2±0,8 [#] | 0,8±0,1 [#] | 0,9±0,1 [#] |
| Алкоголизи- рованные, 6а (n = 10) | Натошак | 3,4±0,3* | 3,2±0,3* | 3,0±0,4* | 0,2±0,1* | 0,4±0,1* |
| | Глюкозная нагрузка | 5,0±0,4* [#] | 4,8±0,4* [#] | 4,3±0,3* [#] | 0,2±0,1* | 0,7±0,1* [#] |

Примечания: * – статистически значимые различия по сравнению с аналогичными показателями контрольной группы здоровых крыс (6к);

– статистически значимые различия показателей до и после глюкозной нагрузки внутри одной группы, $p < 0,001$.

Введение глюкозы в *v. femoralis*, как и следовало ожидать, приводило у алкоголизованных животных к повышению уровня гликемии, по сравнению с пробами натошак ($p < 0,001$): в *a. carotis communis* – до $5,0 \pm 0,4$ ммоль / л, $p < 0,001$; в *confluens sinuum* – до $4,8 \pm 0,4$ ммоль / л, $p < 0,001$; в *v. femoralis* – до $4,3 \pm 0,3$ ммоль / л, $p < 0,001$; повышение артериовенозной разницы для всего организма в целом до $0,7 \pm 0,1$ ммоль / л ($p < 0,001$). Но стало неожиданным фактом, что это не приводило к увеличению артериовенозной разницы для мозга: она оставалась на уровне $0,2 \pm 0,1$ ммоль / л ($p > 0,001$) (таблица 5). Поскольку

кратковременное восстановление нормогликемии не привело к нормализации усвоения глюкозы мозгом, это позволяет думать, что при алкоголизме причина снижения утилизации глюкозы мозгом – не гипогликемия, а неспособность самого мозга усваивать этот субстрат. Наиболее вероятная причина, которую можно предположить, – это снижение ферментативной активности гликолиза.

3.6 Изменение активности ферментов гликолиза и энергетического обмена в различных зонах головного мозга в результате принудительной алкоголизации

Можно предположить, что в алкоголизированном организме снижение способности мозга утилизировать глюкозу происходит по причине перестройки внутриклеточного метаболизма. Алкоголь оказывает влияние на внутриклеточный метаболизм и нейротрансмиссию в отделах головного мозга, формирующих так называемую систему вознаграждения. В формировании алкогольной зависимости важную роль играют следующие структуры мезокортиколимбической системы: прилежащее ядро, центральное ядро миндалевидного тела, префронтальная кора. В клетках этих зон гистоэнзимологическим методом после вывода животных из эксперимента изучалась активность ферментов мозга, играющих ключевую роль в процессах углеводного и энергетического обмена. В тканях мозга алкоголизированных животных отмечалось статистически значимое снижение активности ЛДГ, Г-6-ФДГ и СДГ. Это свидетельствует о выраженных нарушениях углеводного метаболизма, энергетического обмена, снижении активности антиоксидантной системы и нарушении ГАМК-шунта, что может лежать в основе нейромедиаторных нарушений при хронической алкоголизации.

Наиболее выраженное снижение активности ЛДГ было отмечено в нейронах медиального отдела прилежащего ядра и центрального ядра миндалевидного тела – на 44,07 % и 40,73 % соответственно ($p < 0,05$). У алкоголизированных животных активность Г-6-ФДГ в нейронах центрального миндалевидного тела была на 20,03 %, а в префронтальной коре – на 19,99 % ниже, чем у здоровых животных контрольной группы ($p < 0,05$) (таблица 6).

Таблица 6

Влияние принудительной алкоголизации на активность ферментов промежуточного обмена глюкозы в различных отделах головного мозга (усл.ед. оптической плотности), $M \pm m$

| Группа | Фермент | Префронтальная кора | Центральное ядро миндалевидного тела | Медиальный отдел прилежащего ядра |
|----------------------------------|---------|---------------------|--------------------------------------|-----------------------------------|
| Здоровые, бк (n = 10) | ЛДГ | 33,14 ± 2,15 | 31,06 ± 1,27 | 30,97 ± 2,03 |
| | Г-6-ФД | 21,91 ± 1,11 | 23,81 ± 0,79 | 25,10 ± 1,01 |
| | СДГ | 81,91 ± 1,11 | 73,81 ± 0,79 | 75,10 ± 1,01 |
| Алкоголизи рованные, ба (n = 10) | ЛДГ | 21,09 ± 1,21* | 18,41 ± 0,92* | 17,32 ± 0,93* |
| | Г-6-ФД | 17,53 ± 1,11* | 19,04 ± 1,12* | 20,86 ± 2,11* |
| | СДГ | 71,51 ± 1,41* | 68,96 ± 1,15* | 63,61 ± 2,31* |

Примечание: * – статистически значимые различия, по сравнению с аналогичными показателями контрольной группы здоровых крыс (бк), $p < 0,05$

Уровень активности СДГ снизился на 15,30 % в медиальном отделе прилежащего ядра, на 12,70 % в префронтальной коре и в наименьшей степени – в центральном ядре миндалевидного тела – на 6,57%.

Анализ результатов, изложенных в данном разделе, позволяет сделать ряд выводов.

1. Потребление больших количеств этанола сопровождается значительным снижением уровня гликемии ($r_p = -0,59$ при $p < 0,05$), выраженным кетозом ($r_s = 0,85$ при $p < 0,05$), снижением гедонических свойств глюкозы ($r_p = 0,86$ при $p < 0,05$) в срок 16 недель принудительной алкоголизации

2. Степень гедонии и степень гликемии обратно пропорциональны, а выраженность кетоза прямо пропорциональна длительности алкоголизации до 6

недели алкоголизации. В период с 6 по 16 неделю степень гедонии, гипогликемии и кетоза не меняется, несмотря на дальнейшее продолжение алкоголизации.

3. Способность мозга утилизировать глюкозу в результате алкоголизации снижается в 3,5 раза (с $0,7 \pm 0,1$ ммоль/л до $0,2 \pm 0,1$ ммоль/л, $p < 0,001$).

2. При сформированном алкоголизме мозг испытывает более выраженную перестройку углеводного метаболизма, чем организм в целом. Так, в здоровом организме степень поглощения глюкозы мозгом больше, чем для организма в целом: артериовенозная разница для мозга $0,7 \pm 0,1$ ммоль / л, а для организма $0,5 \pm 0,1$ ммоль / л, $p < 0,001$. А в алкоголизированном организме, наоборот, степень поглощения глюкозы мозгом становится меньше, чем для организма в целом: артериовенозная разница для мозга $0,2 \pm 0,1$ ммоль / л, а для организма $0,4 \pm 0,1$ ммоль / л, $p < 0,001$.

3. Степень потребления глюкозы для мозга является жесткой константой. При кратковременной гипергликемии (путем внутривенного введения глюкозы) прирост показателей АВР для головного мозга в 4 раза меньше, чем для организма в целом. А в мозге алкогользависимых животных АВР остается неизменной как натощак, так и после глюкозной нагрузки ($0,2 \pm 0,1$ ммоль / л, $p > 0,001$).

4. Степень потребления глюкозы для организма в целом не является жесткой константой и колеблется в зависимости от уровня гликемии. По условиям кратковременной гипергликемии другие ткани организма начинают поглощать глюкозы немного больше, чем натощак: в здоровом организме $0,9 \pm 0,1$ ммоль / л против $0,5 \pm 0,1$ ммоль / л, $p < 0,001$; в алкогользалежном организме $0,7 \pm 0,1$ ммоль / л против $0,4 \pm 0,1$ ммоль / л, $p < 0,001$.

5. Нарушение способности усваивать глюкозу алкоголизированным мозгом подтверждается снижением активности ЛДГ, Г-6-ФДГ и СДГ разной степени выраженности в зонах, играющих ключевую роль в формировании алкогольной зависимости. Это свидетельствует о внутриклеточных нарушениях углеводного метаболизма, энергетического обмена, снижении активности антиоксидантной системы и нарушении ГАМК-шунта.

Список научных публикаций по теме главы

1. Бортникова А.К. Зависимость предпочтения глюкозы от степени алкоголизма у крыс. – 87-я Всероссийская научно-практическая конференция студентов и молодых учёных, посвящённая 155-летию со дня рождения Л.О. Даршкевича. Сборник тезисов. Казань, 21-22 марта 2013 г. – Казань, 2013. – 348 с.
2. Бортникова А.К., Панова Т.И., Казаков В.Н. Влияние глюкозы на потребление этанола у алкогользависимых крыс. XXII съезд физиологического общества им. И.П. Павлова. Тезисы докладов. Волгоград, 16-20 сентября 2013 г. – Москва–Волгоград: Издательство ВолгГМУ, 2013. – С. 74.
3. Бортникова А.К., Казаков В.Н., Панова Т.И. Снижение способности мозга алкогользависимых крыс утилизировать глюкозу // Архив клинической и экспериментальной медицины. – 2013. – Т. 22, № 2. – С. 161-164.
4. Bortnikova A.K., Panova T.I., Goncharenko O.N. Ketosis at alcoholrelintal rats // 7-th Lviv-Lublin conference of Experimental and Clinical Biochemistry. Abstract book.– Lviv, 2013. P. 141.
5. Bortnikova A.K., Panova T.I. Peculiarities of Utilization of Glucose by Brain Tissues of Alcohol-Dependent Rats // Neurophysiology. – 2014. – V. 46, Issue 3. – P. 206-211.
6. Бортникова А.К., Панова Т.И.. Особенности утилизации глюкозы тканями мозга алкогользависимых крыс // Neurophysiology/ Нейрофизиология. – 2014. – Т. 46, № 3. – С. 229-222.
7. Ильина А.С., Косенко М.А., Бортникова А.К. Критерии формирования устойчивой алкогольной зависимости у крыс в ходе принудительной алкоголизации // Материалы 78-го международного Медицинского конгресса молодых ученых «Актуальные проблемы теоретической и клинической медицины» – Донецк, 2016. – С. 73-74.
8. Бортникова А.К. Оценка влияния длительной экспериментальной алкоголизации на формирование влечения к этанолу, уровень гликемии и гедонии у крыс // Архив клинической и экспериментальной медицины. - 2018. – Т.27, №3. – С.56-61.

ГЛАВА 4

ВЛИЯНИЕ ДЛИТЕЛЬНОЙ МЕТАБОЛИЧЕСКОЙ КОРРЕКЦИИ НА ПАРАМЕТРЫ УГЛЕВОДНОГО ГОМЕОСТАЗА И ВЛЕЧЕНИЕ К ЭТАНОЛУ У АЛКОГОЛЬЗАВИСИМЫХ КРЫС

В предыдущем разделе было показано, что принудительная алкоголизация крыс приводит к ряду нарушений: гипогликемии, кетонурии, потере гедонии, к формированию устойчивого влечения к алкоголю. Но возможна ли обратимость этих метаболических изменений? Или же они остаются навсегда?

Несмотря на открытия в области эпигенетики, известно, что то или иное нарушение (в том числе и нарушение метаболизма, и патологическое влечение к алкоголю) будет удерживаться столько, сколько будут сохраняться нарушения ацетилирования хвостов гистонов или метилирования нуклеотидов в тех участках ДНК, в которых закодирована информация о ферментах образования и утилизации глюкозы, ферментах образования и окисления кетоновых тел. Теоретически, ацетилирование и метилирование может иметь обратимый характер, ведь эпигенетические изменения не влияют на главное – нуклеотидную последовательность ДНК. Значит, вызванные нарушения могут иметь обратный ход. Клетки в частности и организм в целом могут восстановить возникшие в ходе жизни изменения под действием определенных факторов.

В условиях метаболической гипогликемии и кетонемии такими факторами теоретически могут быть две категории веществ:

- или субстрат в большом (даже избыточном) количестве для ферментов гликолиза, то есть глюкоза;
- или отсутствие кетоновых тел, чтобы лишить субстрата ферменты их окисления.

Другими словами, эти факторы должны быть противоположны тем, которые инициировали повреждение клетки. То есть, если причиной перестройки метаболизма в ходе хронической алкоголизации считать дефицит глюкозы, значит

противодействующим фактором должен быть избыток глюкозы, например, усиленное углеводное питание. Если вторым фактором формирования устойчивого влечения к алкоголю считать поддерживаемый в результате потербления этанола высокий уровень кетоновых тел, значит анти-фактором должно быть его снижение. Чтобы проверить эти гипотезы, был организован II этап эксперимента, в ходе которого изучалось, как меняется влечение к алкоголю и гедония под влиянием различных видов метаболической коррекции.

4.1 Динамика изменений параметров углеводного гомеостаза, питьевого режима и влечения к этанолу при метаболической коррекции

В данном эксперименте проверялась концепция принципиальной обратимости изменений, сформированных в ходе хронической алкоголизации, в условиях достаточного насыщения организма глюкозой. Поскольку перестройка углеводного метаболизма в алкогользависимом организме провоцируется длительной алкогольной гипогликемией [3, 154], то дизайн следующего эксперимента базировался на идее от обратного: моделировалась нормогликемия в течение длительного времени. Достигалось это с помощью 30-дневного усиленного принудительного углеводного питания алкоголизованных крыс. Алкоголизованным животным экспериментальной группы 1а (n = 10) в течение 30 дней ежедневно 3 раза в сутки, с интервалом в 5 часов, с помощью шприца Жане вводили *per os* 1 мл заваренного киселя из 40 % крахмала (в пересчете на глюкозу – это 2,0 г/кг массы животного). Алкоголизованным животным группы сравнения 4а (n = 10) таким же образом в течение 30 дней вводили 1 мл 0,9 % раствора NaCl три раза в день. А контрольная группа 1к (n = 10) состояла из здоровых животных с усиленным углеводным кормлением в том же объеме, как и в экспериментальной группе 1а (1 мл киселя из 40% крахмала трижды в сутки).

Длительное принудительное усиленное питание крахмалом способствовало нормализации уровня глюкозы в крови. Так, уровень гликемии у крыс в экспериментальной группе 1а статистически значимо повысился до уровня здоровых крыс уже после первой декады лечения ($6,0 \pm 0,4$ ммоль/л) и оставался

таким практически без изменений ($p > 0,01$), в течение второй ($6,1 \pm 0,6$ ммоль/л) и третьей ($7,1 \pm 0,4$ ммоль/л) декад эксперимента (рисунок 7).

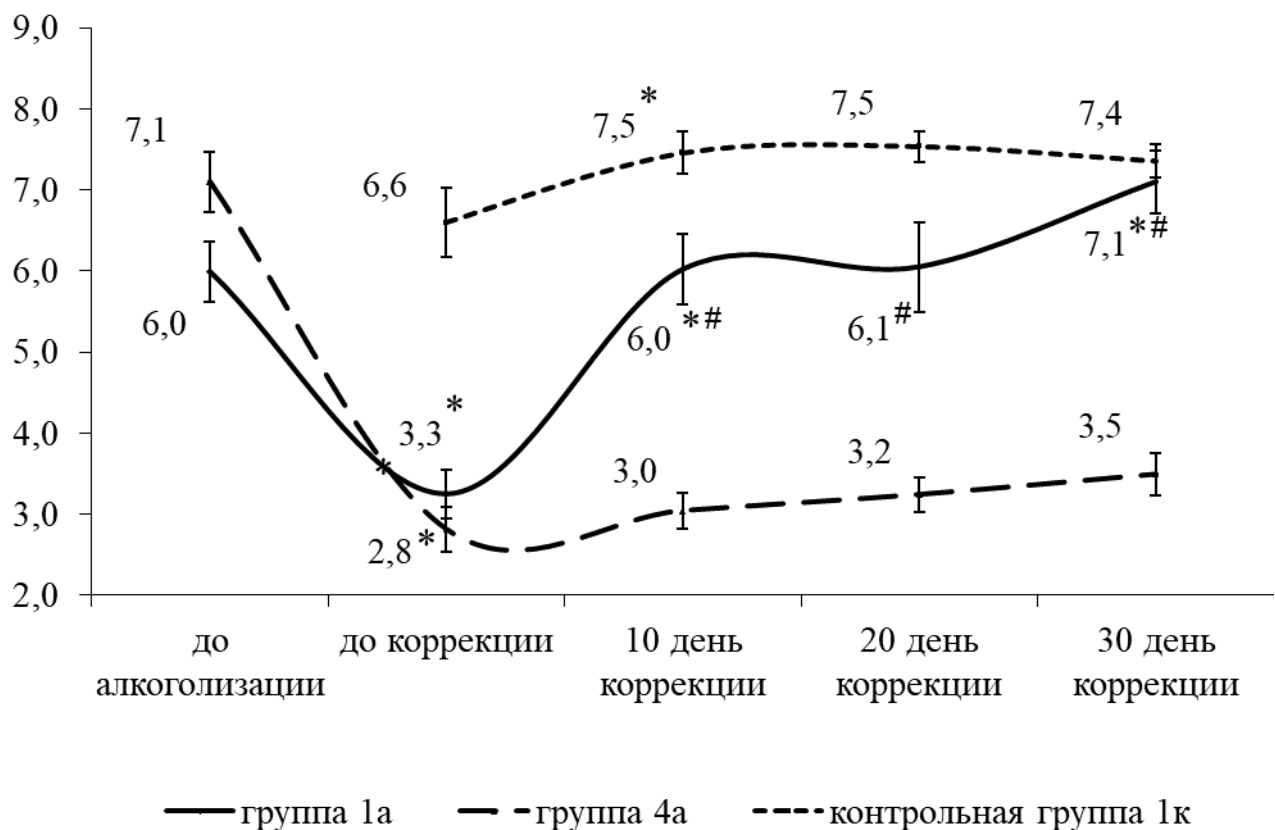


Рисунок 7. Динамика содержания глюкозы в плазме крови крыс 1а, 4а, 1к групп разные экспериментальные периоды (ммоль/л)

Наличие статистически значимых различий ($p < 0,01$):

* – по сравнению с показателями предыдущего контрольного периода;

– по сравнению с показателями 4а группы.

У крыс группы 4а группы без усиленного питания при сравнении показателей гликемии по окончании принудительной алкоголизации ($2,8 \pm 0,4$ ммоль/л) и через 30 дней введения 0,9 % раствора NaCl ($3,5 \pm 0,3$ ммоль/л) различия не были статистически значимыми, $p > 0,01$.

Сравнительный анализ показателей гликемии экспериментальной 1а и 4а групп в одни и те же дни выявил статистически значимые отличия на конец каждой декады, $p < 0,01$ (рисунок 7). Кормление алкогользависимых животных

избытком крахмала приводит к нормализации (повышению) концентрации глюкозы в плазме крови. И к концу 3 декады этот показатель не отличается от среднего значения по данной группе до начала алкоголизации ($7,1 \pm 0,4$ ммоль/л), $p > 0,01$. Однако, даже в конце третьей декады, показатели гликемии и питьевого режима не сравнивались с соответствующими показателями контрольной группы здоровых крыс с 30-дневным усиленным питанием 1 к группы (Приложение 7, таблица 7.1). В данной группе 1к на фоне усиленного углеводного питания уже к концу 1 декады коррекции уровень гликемии был выше, чем до ее начала – $7,5 \pm 0,6$ ммоль/л ($p < 0,01$), и далее удерживался на стабильном уровне. При этом показатели гликемии на фоне усиленного питания не выходили за пределы соответствующей нормы для крыс.

Одновременно отслеживали влияние длительной алиментарной коррекции гликемии на уровень гедонии и потребление воды. Количество потребляемого питья в группах было разным (Приложение 7, таблица 7.1). Это зависело от времени, прошедшего после окончания принудительной алкоголизации.

Усиленное кормление крахмалом у предварительно-алкоголизованных животных сказалось на гедонии к глюкозе лишь в третьей декаде. Причем произошло это скачкообразно. В течение первых 20 дней, несмотря на ежедневное усиленное питание, потребление сладкого раствора в условиях свободного выбора питья оставалось стабильно низким, как и у животных группы сравнения 4а, а с 22 дня начало стремительно увеличиваться. Скачкообразный характер можно объяснить накоплением изменений в клетке. Вероятно, примерно 20 дней требуется для восстановления синтеза достаточного количества соответствующих ферментов гликолиза, поврежденных предшествующей длительной алкоголизацией (рисунок 8). Поскольку у крыс 4а группы, не получавших усиленное питание, потребление сладкого раствора статистически значимо не изменилось даже к концу 30-дневного периода, можно предположить, что именно этот фактор – усиленное насыщение организма алкоголизованных животных глюкозой способствует восстановлению активности ферментов гликолиза, в условиях избытка соответствующего субстрата.

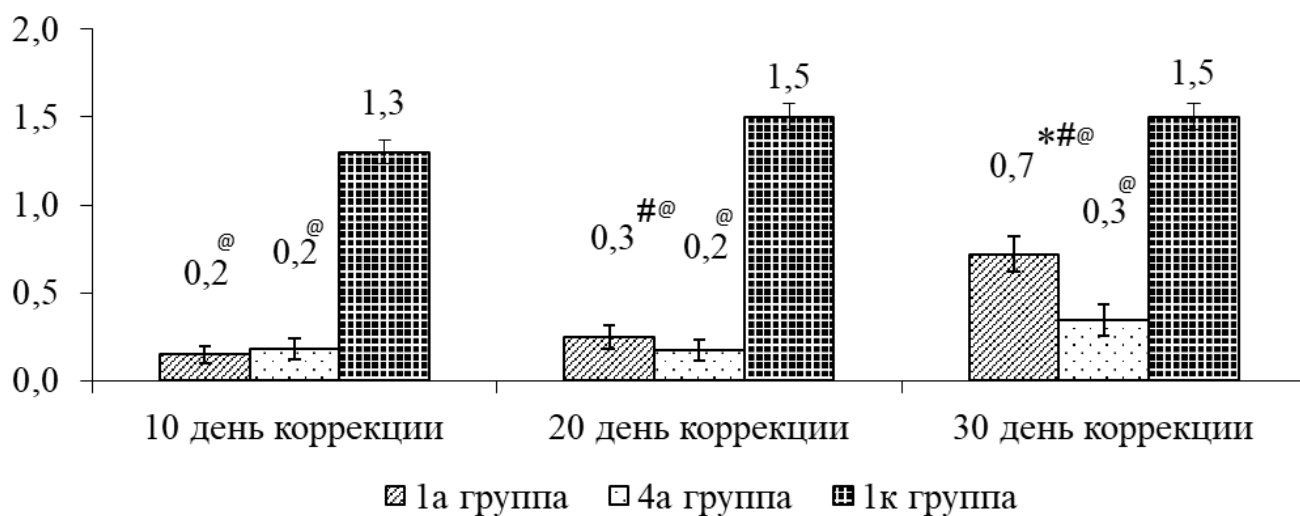


Рисунок 8. Динамика потребления 5 % раствора глюкозы крысами 1а, 4а, 1к групп в отчетные периоды метаболической коррекции (мл / 0,1 кг / сут)

Наличие статистически значимых различий ($p < 0,01$):

* – по сравнению с показателями предыдущего контрольного периода;

– по сравнению с показателями 4а группы;

@ – по сравнению с показателями 1к группы.

На потреблении чистой питьевой воды указанные изменения статистически значимо сказались только у экспериментальной группы 1а в третьей декаде: на 30-й день животные выпивали воды в 2 раза больше, чем на 10-й день коррекции, $p < 0,01$ (рисунок 9). Вероятно, указанное повышение потребления воды обусловлено осмотическими свойствами глюкозы, которой крысы именно в третью декаду стали потреблять больше. Общее потребление жидкости уменьшилось у экспериментальных животных 1а и 4а групп. Крысы 1а группы выпивали жидкости меньше, чем животные 4а. Очевидно, что на фоне возрастания потребления воды и 5 % раствора глюкозы, это снижение количества суммарно потребляемой жидкости крысами 1а группы происходило за счет уменьшения потребления 10 % раствора этанола, чего не произошло у крыс группы 4а.

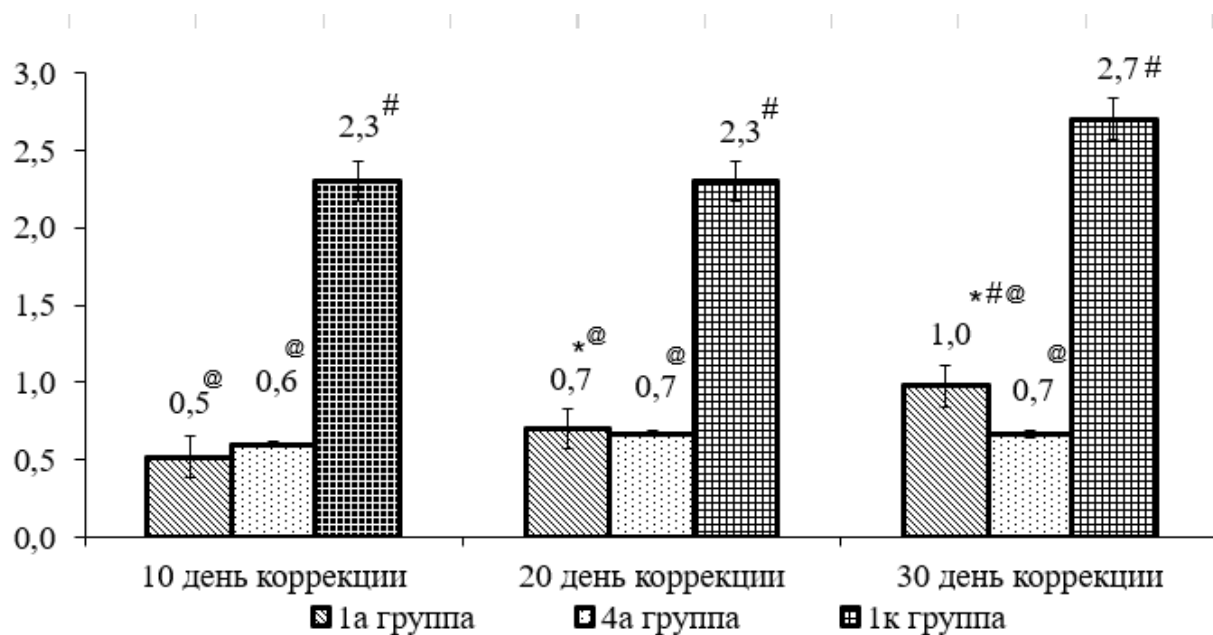


Рисунок 9. Динамика потребления воды крысами 1а, 4а, 1к групп в отчетные периоды метаболической коррекции (мл / 0,1 кг / сут)

Наличие статистически значимых различий ($p < 0,01$):

* – по сравнению с показателями предыдущего контрольного периода;

– по сравнению с показателями 4а группы;

@ – по сравнению с показателями 1к группы.

В контрольной группе здоровых крыс с усиленным питанием статистически значимой динамики питьевого режима не отмечалось.

Отдельно обращает на себя внимание влияние алиментарной коррекции гликемии на влечение к этанолу. Так, принудительное кормление крахмалом в течение 30 дней привело к уменьшению влечения к алкоголю в экспериментальной группе практически в 2 раза: с $4,5 \pm 0,3$ мл / 0,1 кг до $2,6 \pm 1,0$ мл / 0,1 кг /сут ($p < 0,01$). Причем уровень потребления этанола в условиях свободного выбора в этой группе статистически значимо постепенно снижался: от первой ко второй, и от второй к третьей декаде лечения ($p < 0,01$), в отличие от скачкообразных изменений потребления раствора глюкозы. Характерно, что за эти 30 дней крысы группы 4а тоже стали меньше употреблять алкоголя, но в меньшей степени: с $5,6 \pm 0,9$ до $4,5 \pm 1,2$ мл / 0,1 кг / сут (рисунок 10).

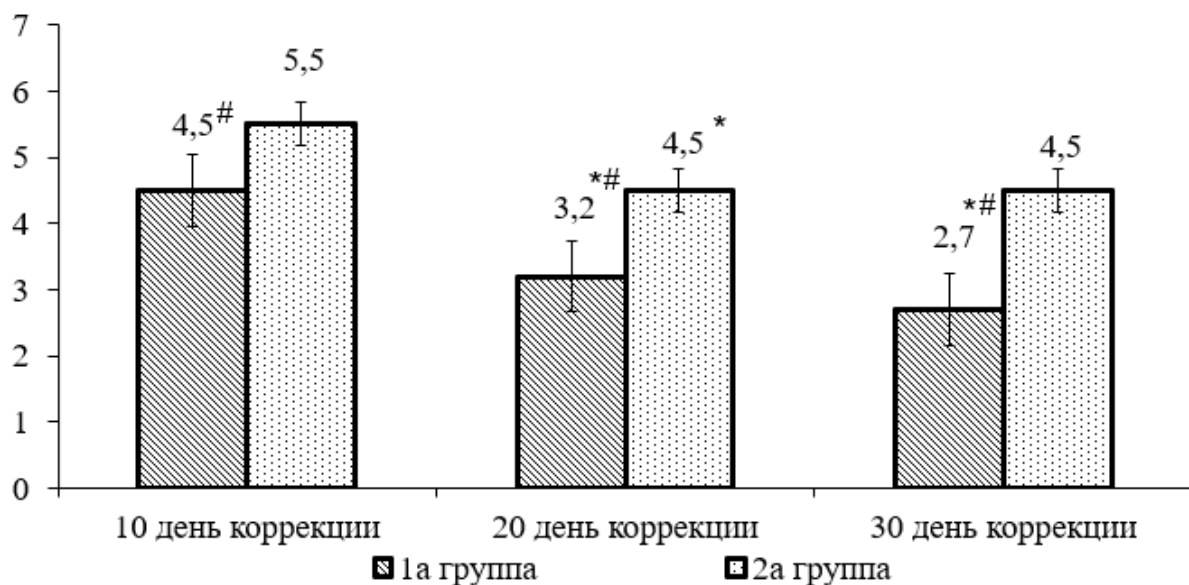


Рисунок 10. Динамика потребления раствора 10% этанола крысами 1а и 4а групп в отчетные периоды метаболической коррекции (мл / 0,1 кг / сут)
Наличие статистически значимых различий ($p < 0,01$):

* – по сравнению с показателями предыдущего контрольного периода;
– по сравнению с показателями 4а группы.

Сравнительный анализ показателей животных экспериментальных 1а и 4а групп в одни и те же дни выявил статистически значимую разницу, начиная уже с конца первой декады ($p < 0,01$). Это дает основание полагать, что именно кормление избытком крахмала приводит к уменьшению влечения к алкоголю. Животные контрольной 1к группы раствор этанола в условиях свободного выбора не употребляли.

Влияние принудительного кормления крахмалом на уровень кетонурии в исследуемых группах в течение данного периода эксперимента отражено в таблице 13.1 (Приложение 13). Из нее видно, что в экспериментальной группе 1а уровень кетонурии значительно снизился уже после первой декады лечения и оставался таким в течение второй и третьей декад. К 30-му дню эксперимента, в группе не было животных с кетонурией более 0,5 ммоль / л (рисунок 11). А 80% животных не имели кетоновых тел в моче.

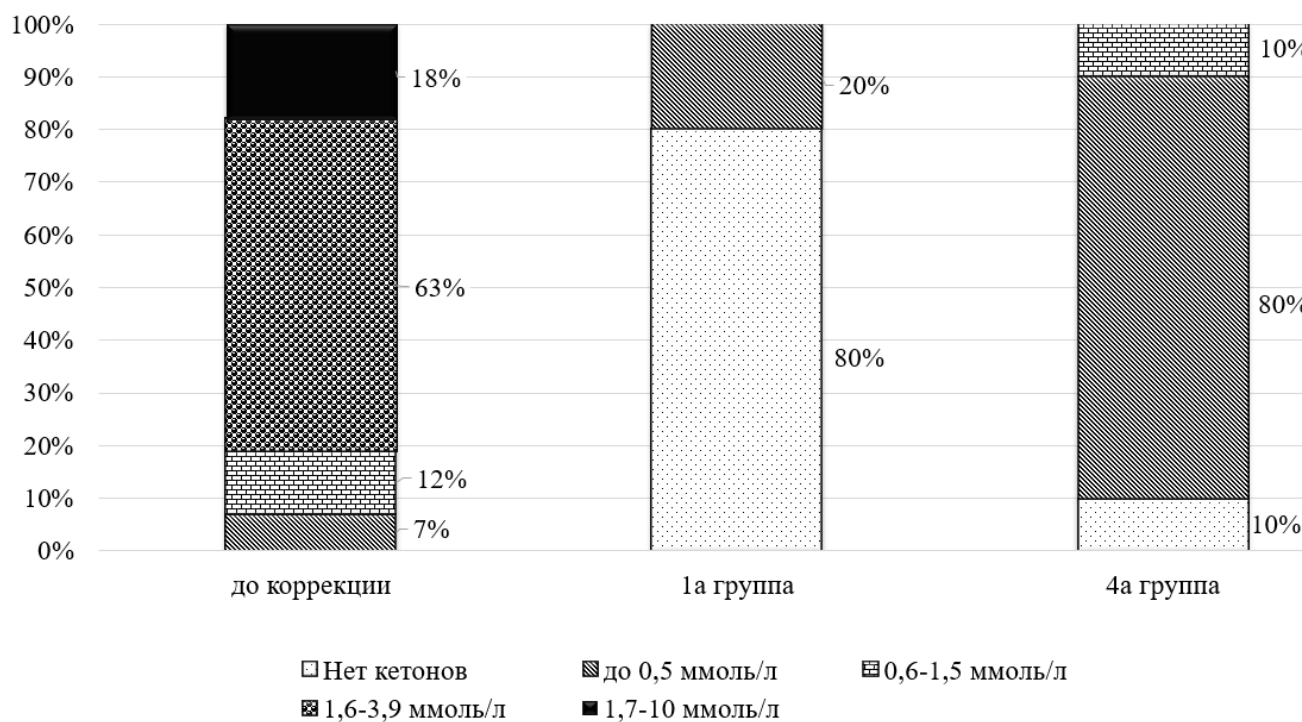


Рисунок 11. Распределение животных с различным уровнем кетонурии в экспериментальных 1а и 4а группах в 30-й день метаболической коррекции, по сравнению с показателями до ее начала

У крыс 4а группы при сравнении показателей кетонурии по окончании принудительной алкоголизации (до начала 2 этапа эксперимента) и на 30-й день введения 0,9 % раствора NaCl отмечалась динамика по снижению выраженности кетонурии (рисунок 11), однако всего 10% крыс не имели кетонов в моче, 80% имели кетонурию до 0,5 ммоль / л и 10% – до 1,5 ммоль / л. У здоровых крыс контрольной группы 1к с усиленным питанием ни до эксперимента, ни после случаев кетонурии обнаружено не было.

Остается без ответа вопрос: почему динамика для разных показателей неодинакова? Ведь теоретически все показатели зависят от одного параметра – количества глюкозы (который нормализовался практически уже в первую декаду усиленного питания). Наибольшая несогласованность наблюдается для динамики таких двух параметров: гликемии и гедонии (в первую и вторую декаду низкая гедония на фоне нормогликемии, а в третью декаду гедония начинает

восстанавливаться, несмотря на практически тот же самый фон нормогликемии). Почему позже восстанавливаются именно гедонические свойства глюкозы?

Также обращает на себя внимание несогласованность еще двух параметров: динамики восстановления гедонии к глюкозе и динамики уменьшения влечения к алкоголю. Уменьшение влечения к алкоголю минимум на 10 дней опережает восстановление гедонии. Такой результат, хотя и косвенно, ставит под сомнение вероятный вывод относительно того, что гипогликемия является непосредственной причиной влечения к алкоголю. Поскольку гедония обусловлена исключительно состоянием мозга, возникла потребность провести дополнительное исследование по способности мозга утилизировать глюкозу.

В эксперименте по изучению влияния метаболической коррекции унитиолом контрольными группами служила группа сравнения 4а и контрольная группа 3к –здоровые животные с 30-дневным введением унитиола (n = 10).

30-дневное кормление раствором унитиола в экспериментальной группе 2а привело к уменьшению содержания кетоновых тел в моче (рисунок 12).

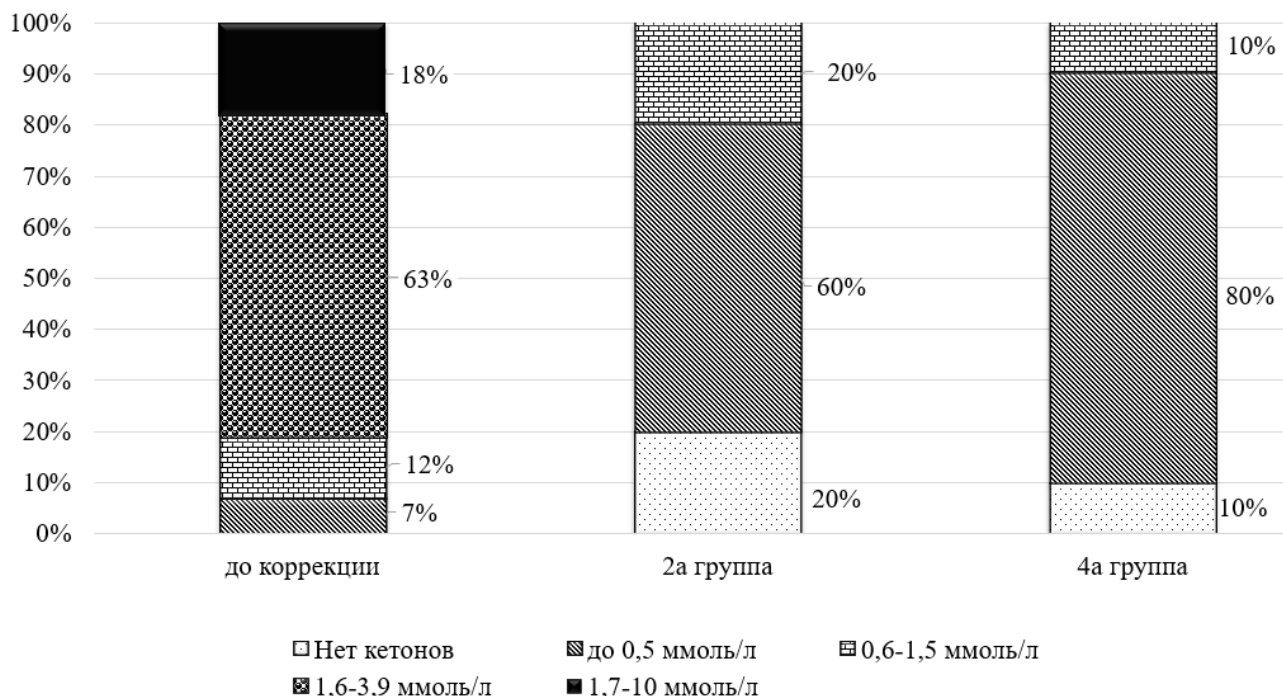


Рисунок 12. Распределение животных с различным уровнем кетонурии в экспериментальных 2а и 4а группах в 30-й день метаболической коррекции, по сравнению с показателями до ее начала

Такой результат является вполне ожидаемым, согласно фармакологическому действию вещества унитиол. Причем снижение кетоза было весьма существенным: у большинства крыс в 2-3 раза. Например, у двух крыс – снижение с 1,7-10,0 ммоль / л до 1,6-3,9 ммоль / л; у пяти крыс – с 1,6-3,9 ммоль / л до 0,6-1,5 ммоль / л. А у трех крыс уменьшение кетонурии было более, чем в 6 раз: с 0,6-1,5 ммоль/л до 0 ммоль/л. Интересно, что у крыс группы сравнения 4а уровень кетонурии тоже снизился, несмотря на то, что вместо метаболической коррекции они получали 0,9 % раствор NaCl, но это динамика была менее выраженной и наблюдалась позже, чем у крыс группы 2а (Приложение 8, таблица 8.1). Этот результат также является прогнозируемым. Но совсем неожиданным является результат сопоставления влияния на уровень кетонурии различных видов коррекций: усиленное кормление крахмалом (в 1а группа) привело к более кардинальному уменьшению кетонемии, чем метаболическая коррекция унитиолом. Возможно, определенное содержание кетоновых тел для алкогользависимого организма становится своеобразной константой гомеостаза, поэтому связывание и выведение кетоновых тел унитиолом по принципу отрицательной обратной связи побуждает организм восстанавливать этот уровень снова и снова.

На конец принудительной алкоголизации у всех алкоголизированных крыс ($n = 60$) наблюдалась выраженная гипогликемия $3,00 \pm 0,13$ (95 % ДИ: 2,75-3,26). 30-дневная метаболическая коррекция унитиолом не способствовала восстановлению гликемии до уровня здоровых животных ($p < 0,01$) и не влияла на динамику уровня гликемии. Это вытекает из сравнения величин гликемии крыс группы сравнения 4а, которые получали 0,9% раствор NaCl, и крыс группы 2а, которые получали унитиол, в конце каждой декады коррекции – статистически значимых различий выявлено не было, $p > 0,01$ (Приложение 7, таблица 7.1). Таким образом, устранение гипогликемии устраняет кетоз, а вот снижение кетоза не устраняет гипогликемию. Это является экспериментальной иллюстрацией причинно-следственных взаимоотношений двух биохимических процессов в

организме, где причиной является именно гипогликемия, а кетоз – это лишь следствие.

В ходе метаболической коррекции унитиолом влечение к алкоголю, как и метаболические показатели (гликемия, кетонемия), хотя и менялись, но минимально. Даже через 30 дней непрерывной коррекции унитиолом, потребление этанола в условиях свободного выбора оставалось достаточно высоким: $5,1 \pm 0,3$ мл / $0,1$ кг / сут (Приложение 7, таблица 7.1), хотя это и меньше, чем было до коррекции: $6,3 \pm 0,6$ мл / $0,1$ кг / сут, $p < 0,01$. Наблюдаемое уменьшение потребления алкоголя произошло в самом начале, уже в течение первой декады коррекции унитиолом. И хотя дальнейшая коррекция на 20-й день привела к снижению влечения к этанолу ($p < 0,01$), это было временное явление. И в конце 30-дневного эксперимента потребление этанола при контроле в условиях свободного выбора вернулось на уровень первой декады ($p > 0,01$).

Оказалось, что при сравнении показателей питьевого режима у крыс 2а и 4а групп по каждой декаде, между группами не было выявлено статистически значимых различий ($p > 0,01$). Это свидетельствует о том, что на динамику влечения к этанолу влияла, очевидно, не коррекция унитиола, а сам факт отмены принудительной алкоголизации.

Полученные данные заставляют по-иному посмотреть на роль кетоза и выдвинутую рабочую гипотезу о наличии не прямой, а обратной причинно-следственной связи между кетозом и влечением к алкоголю. Зафиксированный факт, что длительное введение препарата унитиола крысам не уменьшает потребление алкоголя, свидетельствует, на наш взгляд, о том, что искусственное устранение кетоза, лишая мозг питательного субстрата, лишь провоцирует организм на продолжение потребления этанола, который является мощным стимулятором процесса кетонообразования. Иными словами, введение унитиола не устраняет влечение к алкоголю, и возможно способствует стабилизации зависимости. Положительный же эффект его введения при острых состояниях обусловлен устранением ацидоза и токсического действия кетоновых тел на мозг, и как следствие, устранение неприятных субъективных ощущений.

Еще одним подтверждением сделанного вывода может быть то, что, несмотря на длительное введение раствора унитиола, концентрация кетоновых тел в моче не снижалась значительно, оставаясь хотя и не на высоком, но стабильном уровне (до 0,5 ммоль / л). Объяснение факта наличия кетоновых тел в моче, несмотря на введение унитиола, частично может вытекать из фармакодинамики препарата. Период полураспада унитиола составляет $7,5 \pm 0,46$ ч. Время пребывания в крови 9-11 часов. Так как между последним введением унитиола (в 17 часов дня) и определением его в моче (в 8 часов утра) проходило около 15 часов, то концентрация кетоновых тел, вероятно, успевала заново восстанавливаться и нарастать.

Потребление раствора глюкозы крысами 2а группы не изменилось в течение 30 дней коррекции и статистически значимо не отличалось от показателей животных группы сравнения 4а, получавших вместо унитиола 0,9% раствор натрия хлорида в течение этих 30 дней ($p > 0,01$).

Согласно изложенному выше, сравнение эффективности двух метаболических коррекций выявило, что, во-первых, коррекция гликемии путем усиленного кормления крахмалом является более эффективной, чем коррекция унитиолом, в отношении восстановления нормогликемии, гедонии, снижения кетоза и даже в отношении снижения влечения к алкоголю.

Ввиду этого особый интерес вызывает эксперимент по сочетанной метаболической коррекции с введением раствора унитиола и усиленного питания крахмалом. В этом эксперименте группой сравнения служила та же самая 4а группа, что и для коррекцией гликемии, и для коррекции унитиолом – предварительно алкоголизированные с 30-дневным введением 0,9% раствора натрия хлорида. Дополнительно контрольной группой была группа здоровых крыс с 30-дневным усиленным питанием и введением унитиола 3к.

Рассмотрение результатов этого эксперимента, конечно, же надо проводить в постоянном сравнении с результатами предыдущих экспериментов по отдельной коррекции гликемии и отдельной коррекции унитиолом. Через 30 дней сочетанной коррекции выраженность кетонурии была сходна соответствующей

картине при коррекции путем усиленного кормления крахмалом. На 30-й день у семи крыс 3а группы кетонов в моче не было вовсе, а у двух крыс-минимальное количество (до 0,5 ммоль / л). У крыс контрольной группы 3к кетоновых тел в моче обнаружено не было.

Изменения уровня гликемии при сочетанной коррекции были такими же, как изменения при отдельной коррекции усиленным кормлением. И в первую, и во вторую, и в третью декады лечения показатели гликемии этих двух групп (1а и 3а) не отличались между собой, $p > 0,01$ (Приложение 7, таблица 7.1). И, соответственно, статистически значимо отличались от показателей группы сравнения 4а, и от показателей группы 2а, где проводилась коррекция унитиолом, $p < 0,01$. Это свидетельствует о максимальной эффективности коррекции гликемии путем усиленного кормления. То есть можно утверждать, что в клинической практике при необходимости (по определенным показателям) применять препараты унитиола, чрезвычайно целесообразно сопровождать это усиленным кормлением, особенно, когда речь идет о длительном лечении унитиолом.

Изменение влечения к алкоголю в ходе сочетанной метаболической коррекции подчинялось той же самой тенденции, что и изменение уровня кетонурии. А именно: самым эффективным для снижения потребления этанола у алкогользависимых крыс оказалось усиленное кормление раствором крахмала, а наименее эффективным – введение унитиола (Приложение 7, таблица 7.1). Совместное же использование унитиола и усиленного кормления дало промежуточные результаты.

Так, например, в конце третьей декады крысы в 3а группе (), потребляли алкоголя $3,5 \pm 1,5$ мл / 0,1 кг / сут, что было в 1,3 раза больше, чем животные 1а группе ($2,7 \pm 1,0$ мл / 0,1 кг / сут), $p < 0,01$. Но это в 1,5 раза меньше, чем крысы группы, получавшей коррекцию только унитиолом ($5,1 \pm 1,0$ мл / 0,1 кг / сут), $p < 0,01$ (рисунок 13).

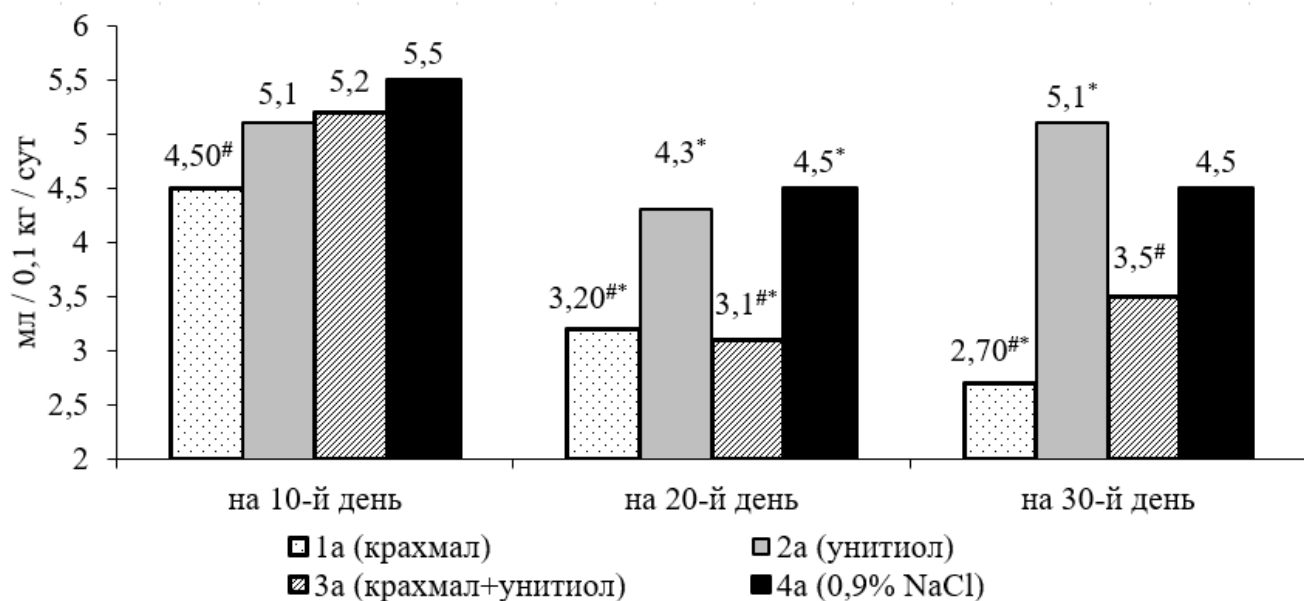


Рисунок 13. Динамика потребления раствора 10% этанола подопытными крысами 1а - 4а групп в отчетные периоды метаболической коррекции (мл / 0,1 кг / сут)

Наличие статистически значимых различий ($p < 0,01$):

* – по сравнению с показателями предыдущего контрольного периода;

– по сравнению с показателями 4а группы.

Сравнение именно этого показателя (влечения к этанолу) по уровню его потребления в условиях свободного выбора в группах с различными видами метаболической коррекции свидетельствует в пользу необходимости при возможной терапии хронического алкоголизма унитиолом обязательного дополнения или усиленным углеводным питанием, или проводить его на фоне внутривенного введения растворов глюкозы.

Из таблицы 12.1 (Приложение 12) видно, что потребление раствора 5% глюкозы лучше всего восстанавливалось в случае, когда алкоголизованных крыс усиленно кормили крахмалом (группы 1а и 3а), и хуже всего при коррекции унитиолом (группа 2а). Анализируя результаты этого раздела, можно сделать вывод, 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, чтобы в схеме коррекции было устранение гипогликемии, и очень важно, чтобы такая коррекция не была скоротечной.

4.2 Изменение способность головного мозга и организма в целом утилизировать глюкозу при метаболической коррекции гликемии

В ходе принудительной алкоголизации были получены результаты, которые косвенно указывали на уменьшение потребности в глюкозе у алкогользависимых крыс ввиду уменьшения способности алкогользависимого мозга утилизировать глюкозу. Для изучения возможной обратимости данных нарушений были изучены показатели АВР по глюкозе натощак и после кратковременной внутривенной глюкозной нагрузки, а также после длительной метаболической коррекции путем усиленного углеводного питания (таблица 7).

Таблица 7

Влияние 30-дневного усиленного питания крахмалом на усвоение глюкозы мозгом и организмом в целом у здоровых и алкогользависимых крыс

| Группы | | Условия забора крови | Концентрация глюкозы в крови разных сосудов, ммоль/л | | | АВР по глюкозе, ммоль/л | |
|----------|--------------|----------------------|--|------------------------|-----------------------|-------------------------|-----------------------|
| | | | <i>Arteria carotis communis</i> | <i>Confluent sinus</i> | <i>Vena femoralis</i> | Мозга | Общая |
| Здоровые | бк (n=10) | Натощак | 7,5±0,6 | 6,8±0,6 | 7,0±0,6 | 0,7±0,1 | 0,5±0,1 |
| | | Нагрузка | 9,1±0,8 [#] | 8,3±0,8 [#] | 8,2±0,8 [#] | 0,8±0,1 [#] | 0,9±0,1 [#] |
| | 1к (n=10) | Натощак | 7,6±0,3 | 6,9±0,5 | 7,1±0,4 | 0,7±0,2 | 0,7±0,3* |
| | | Нагрузка | 9,8±0,4 [#] | 9,0±0,6 [#] | 8,9±0,3 [#] | 0,8±0,1 [#] | 0,9±0,3 [#] |
| А | ба (n=10) | Натощак | 3,4±0,3* | 3,2±0,3* | 3,0±0,4* | 0,2±0,1* | 0,4±0,1* |
| | | Нагрузка | 5,0±0,4* [#] | 4,8±0,4* [#] | 4,3±0,3* [#] | 0,2±0,1* | 0,7±0,1* [#] |

| | | | | | | |
|--------------|----------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|
| 1a (n=10) | Натошак | 6,4±0,6* [!] | 5,8±0,6* [!] | 5,8±0,5* [!] | 0,6±0,2* [!] | 0,5±0,1 [!] |
| | Нагрузка | 8,4±0,4 ^{#!} | 7,7±0,5* ^{#!} | 7,5±0,3 ^{#!} | 0,7±0,3* ^{#!} | 0,9±0,2 ^{#!} |
| 4a (n=10) | Натошак | 4,8±0,5* [!] | 4,6±0,4* [!] | 4,4±0,4* [!] | 0,2±0,1* | 0,4±0,2* |
| | Нагрузка | 6,8±0,6* ^{#!} | 6,6±0,3* ^{#!} | 6,1±0,5* ^{#!} | 0,2±0,2* | 0,7±0,1* ^{#!} |

Примечание: * – статистически значимые различия по сравнению с аналогичными показателями контрольной группы здоровых крыс (6к);

– статистически значимые различия показателей до и после глюкозной нагрузки внутри одной группы, $p < 0,001$;

! – статистически значимые различия, по сравнению с показателями алкоголизованных животных без метаболической коррекции (6а группа), $p < 0,001$.

Длительное, в течение 30 дней, усиленное питание густым киселем из крахмала у здоровых крыс (1к группа) не привело к статистически значимому изменению гликемии натошак: в а. carotis communis она оставалась на уровне $7,6 \pm 0,3$ ммоль / л, $p > 0,001$; в confluens sinuum $6,9 \pm 0,5$ ммоль / л, $p > 0,001$, а в v. femoralis $7,1 \pm 0,4$ ммоль / л, $p > 0,001$. АВР по глюкозе для мозга тоже не изменилась, сохраняя значения $0,7 \pm 0,2$ ммоль / л, $p > 0,001$ (таблица 7).

Но АВР для целого организма выросла в среднем на $0,2$ ммоль / л ($p < 0,001$) и достигла такого же значения, как аналогичный показатель для мозга: $0,7 \pm 0,3$ ммоль / л (рисунок 14). Характер таких изменений указывает на напряжение инсулярного аппарата и усиленную секрецию инсулина, что обеспечивает, во-первых, увеличение поглощения глюкозы мышцами и печенью, но не мозгом, и, во-вторых, сохранение нормогликемии, несмотря на усиленное питание. Сохранение АВР для мозга на прежнем уровне, характерном для обычного режима питания, лишний раз свидетельствует о жестком поддержании констант гомеостаз в тканях головного мозга и о мощных регуляторных механизмах, которые обеспечивают этот гомеостаз, причем эти механизмы не контролируются инсулином.

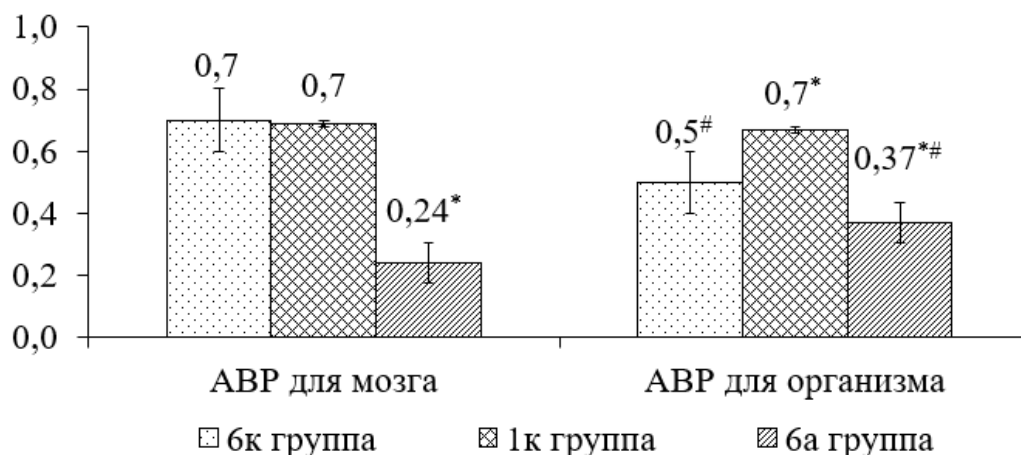


Рисунок 14. Показатели АВР по глюкозе для мозга и организма в целом в 1к, 6к, 6 а группах (ммоль / л)

Наличие статистически значимых различий ($p < 0,001$):

* – по сравнению с показателями здоровых животных (6к группы);

– по сравнению с показателями АВР для мозга.

Кратковременная внутривенная нагрузка глюкозой у животных 1к группы провоцировала гипергликемию: в а. carotis communis – до $9,8 \pm 0,4$ ммоль / л, $p < 0,001$; в confluens sinuum – до $9,0 \pm 0,6$ ммоль / л, $p < 0,001$, а в v. femoralis $8,9 \pm 0,3$ ммоль / л, $p < 0,001$. Интересно, что степень утилизации глюкозы тканями, хотя и повысилась по сравнению с показателями натошак, но не превысила аналогичные показатели при кратковременной глюкозной нагрузке у контрольных здоровых животных, которые не подвергались дополнительному усиленному питанию (6к группа). По-видимому, для мозга величину глюкозы $0,8 \pm 0,1$ ммоль / л следует считать той максимальной, которую мозг способен усвоить (даже в экстремальных ситуациях нагрузочной пробы). Аналогично, для других тканей организма величину $0,9 \pm 0,2$ ммоль / л следует считать той предельной, усвоение которой может обеспечить максимально функционирующий инсулярный аппарат. Эти величины характеризуют резервные возможности углеводного обмена в тканях организма и головного мозга, в частности.

30-дневная коррекция углеводного метаболизма у алкогользависимых животных 1а группы путем ежедневного употребления больших количеств крахмала привела к двукратному увеличению уровня гликемии. Натощак в а. carotis communis глюкозы было $6,4 \pm 0,6$ ммоль / л, $p < 0,001$; в confluens sinuum $5,8 \pm 0,6$ ммоль / л, $p < 0,001$, и в v. femoralis тоже $5,8 \pm 0,5$ ммоль / л, $p < 0,001$. На фоне нормализации гликемии увеличилась и АВР для мозга на $0,4$ ммоль / л ($p < 0,001$), достигнув $0,6 \pm 0,2$ ммоль / л. И хотя эта величина меньше, чем у здоровых крыс ($0,7 \pm 0,1$ ммоль / л), $p < 0,001$, но все-таки больше, чем у алкоголизованных без коррекции 4а группы ($0,2 \pm 0,1$ ммоль / л), $p < 0,001$. АВР для целого организма выросла, по сравнению с показателями 4а группы, на $0,1$ ммоль / л ($p < 0,001$) и даже достигла своего нормального значения – $0,5 \pm 0,1$ ммоль / л – такой же, не отличаясь от показателя здоровых крыс б к группы, $p > 0,001$ (рисунок 15.).

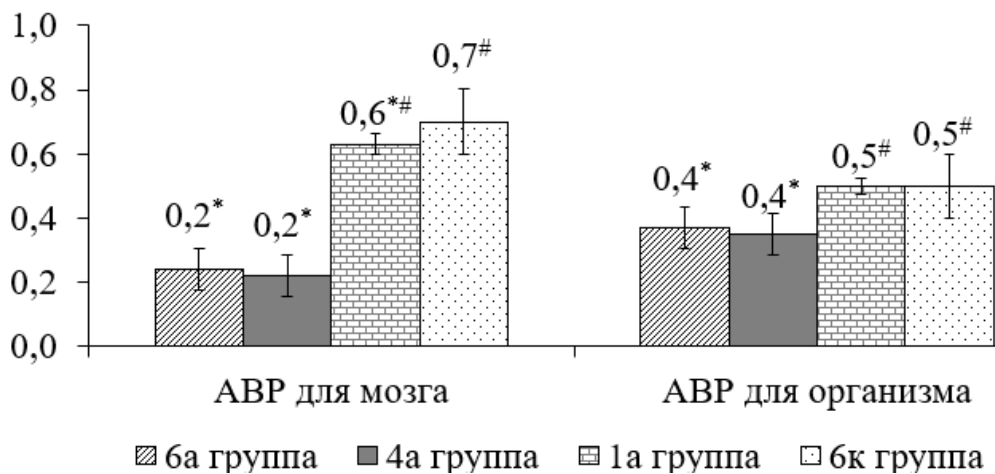


Рисунок 15. Показатели АВР по глюкозе для мозга и организма в целом в 1а, 4а, 6а, 6к группах (ммоль / л)

Наличие статистически значимых различий ($p < 0,001$):

* – по сравнению с показателями здоровых животных (6к группы);

– по сравнению с показателями алкоголизованных животных без коррекции (6а группы).

Несмотря на то, что артериовенозная разница для мозга еще не достигла своих нормальных значений, а артериовенозная разница для всего организма – уже достигла, все же можно думать, что в ходе метаболической коррекции углеводного более быстрыми темпами восстанавливается углеводный обмен мозга, чем других тканей организма. Это еще более ясно, если учесть, что изначально нарушения метаболизма в мозге были более глубокими и выраженными. Это говорит о высокой пластичности и мощных регуляторных механизмах гомеостаза в мозге.

Внутривенная глюкозная нагрузка крысам 1а группы привела к повышению гликемии у этих животных по сравнению с пробами натощак: в *a. carotis communis* уровень глюкозы повысился до $8,4 \pm 0,4$ ммоль / л, $p < 0,001$; в *confluens sinuum* $7,7 \pm 0,5$ ммоль / л, $p < 0,001$, в *v. femoralis* $7,5 \pm 0,3$ ммоль / л, $p < 0,001$. Но примечательно, что в этих условиях АВР для мозга не достигла своей максимально возможной величины (показателей здоровых крыс в условиях глюкозного нагружки, 1к группы – $0,8 \pm 0,1$ ммоль / л), $p < 0,001$, а поднялась только до нормальных значений натощак $0,7 \pm 0,3$ ммоль / л, $p > 0,001$ (рисунок 16).

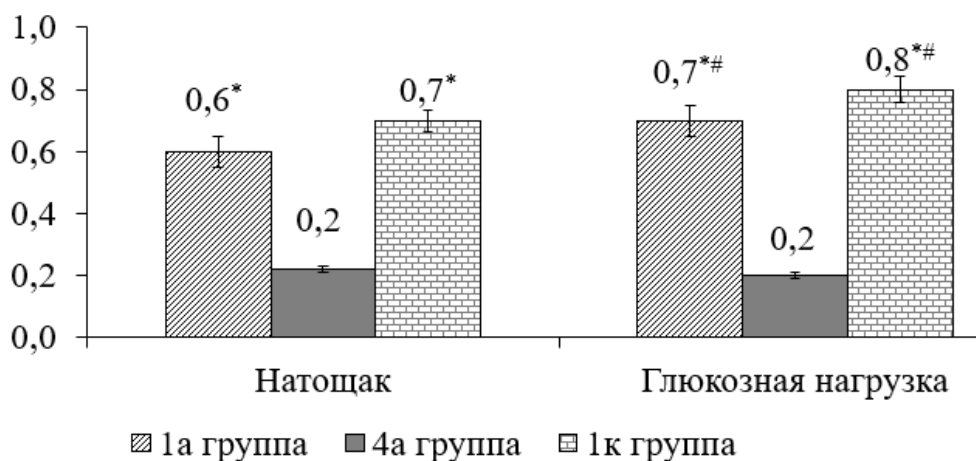


Рисунок 16. Показатели АВР по глюкозе для мозга в 1а, 4а, 1к группах (ммоль / л)

Наличие статистически значимых различий ($p < 0,001$):

– по сравнению с показателями натощак;

* – по сравнению с показателями 4а группы.

Наоборот, артериовенозная разница для всего организма достигла своего максимально возможного значения (показателей здоровых крыс в условиях глюкозного нагрузки) – $0,9 \pm 0,2$ ммоль / л, $p > 0,001$. Такая динамика подтвердила наблюдение о большей лабильности мышечной и других тканей организма, по сравнению с нервной, относительно возможностей углеводного обмена. Константы мозга, напротив, минимально изменяются в физиологических условиях. Кроме того, эти результаты несут еще и дополнительную информацию: косвенно они свидетельствуют о том, что использованная принудительная углеводная диета не превысила возможности инсулярного аппарата.

У крыс 4а группы за 30 дней, прошедших после отмены алкоголя, в условиях отсутствия метаболической коррекции и введения 0,9 % раствора NaCl, уровень гликемии повысился, хотя и в меньшей степени, чем у животных, находившихся на принудительном интенсивном углеводном питании. А именно: в *a. carotis communis* уровень глюкозы повысился до $4,8 \pm 0,5$ ммоль / л, $p < 0,001$; в *confluens sinuum* – до $4,6 \pm 0,4$ ммоль / л, $p < 0,001$, в *v. femoralis* – до $4,4 \pm 0,4$ ммоль / л, $p < 0,001$. Но АВР оставалась такой же низкой, как и сразу после окончания принудительной алкоголизации, для мозга – на уровне $0,2 \pm 0,1$ ммоль / л, $p > 0,001$ (рисунок 16), и для всего организма – на уровне $0,4 \pm 0,2$ ммоль / л, $p > 0,001$ (таблица 7). С одной стороны, увеличение гликемии может говорить о восстановительных процессах, но протекающих с меньшей скоростью и / или в меньшей степени, чем в группе животных, получавших метаболическую коррекцию путем усиленного питания. А с другой стороны, сохранение артериовенозной разницы на низком уровне может свидетельствовать о стабилизации метаболических нарушений, произошедших ранее, в процессе принудительной алкоголизации, то есть о невозможности восстановления способности мозга утилизировать глюкозу при отмене алкоголя, но без соответствующей поддерживающей терапии.

Кратковременная глюкозная нагрузка у животных третьей подгруппы приводила к повышению концентрации глюкозы в крови: у *a. carotis communis* $6,8$

$\pm 0,6$ ммоль / л, $p < 0,001$; в *confluens sinuum* $6,6 \pm 0,3$ ммоль / л, $p < 0,001$; у *v. femoralis* $6,1 \pm 0,5$ ммоль / л, $p < 0,001$. Но артериовенозная разница увеличивалась только для всего организма – до $0,7 \pm 0,3$ ммоль / л, $p < 0,001$. А для мозга артериовенозная разница осталась на прежнем, низком уровне – $0,2 \pm 0,2$ ммоль / л. Как следует из вышеизложенного, точно такая же динамика была характерна для алкоголизованных животных первой подгруппы, исследованных сразу по истечении 90-дневной принудительной алкоголизации, то есть на пике алкогольной зависимости (таблица 7.1). Другими словами, несмотря на то, что в течение 30 дней у крыс в рационе не было этанола – как было показано ранее, мощного стимулятора кетоза – мозг не успел перестроиться с утилизации кетоновых тел обратно на утилизацию глюкозы. Это сопоставимо с результатами, полученными ранее: кетоз у таких животных сохраняется еще длительное время после отмены алкоголя. Эти результаты можно трактовать как низкую способность мозга быстро переключаться с одного типа питания на другой. В целом, это говорит о жестком гомеостазе в тканях головного мозга. Интегрируя данные этого и предыдущего разделов, можно утверждать, что алкоголизованный мозг «отказывается» от потребления глюкозы в пользу кетоновых тел, а гипогликемия не является непосредственной причиной влечения к алкоголю на стадии сформированной алкогольной зависимости. Снижение утилизации глюкозы может быть обусловлено критическим снижением количества и/или активности ферментов гликолиза.

4.3 Изменение мощности углеводного и энергетического обмена в клетках головного мозга при метаболической коррекции

Анализ результатов предыдущих разделов позволили предположить, что в алкоголизованном организме снижение способности мозга утилизировать глюкозу происходит по причине перестройки внутриклеточного метаболизма. Это подтверждается результатами гистоэнзимологического исследования головного мозга, которые демонстрируют снижение активности ферментов гликолиза и цикла Кребса, особенно в области прилежащего ядра (таблица 8).

Активность ЛДГ в различных отделах головного мозга длительно алкоголизованных животных до и после метаболической коррекции (усл.ед. оптической плотности), $M \pm m$

| Группы | | Префронтальная кора | Центральное ядро миндалевидного тела | Медиальный отдел прилежащего ядра |
|--|----|---------------------------|--------------------------------------|-----------------------------------|
| Лактатдегидрогеназа | | | | |
| бк - контрольная группа (здоровые) | | 33,14±2,15 | 31,06±1,27 | 30,97±2,03 |
| ба – алкоголизованные без коррекции | | 21,09 ± 1,21 [#] | 18,41 ± 0,92 [#] | 17,32 ± 0,93 [#] |
| После 30 дней метаболической коррекции | 1а | 28,89±0,67 ^{#*} | 27,63±2,17 [*] | 31,73±2,8 [*] |
| | 2а | 13,48±1,03 ^{#*} | 12,81±0,99 ^{#*} | 9,54±0,91 ^{#*} |
| | 3а | 29,24±1,53 [*] | 29,20±2,73 [*] | 29,30±1,6 [*] |
| | 4а | 15,66±1,95 ^{#*} | 13,17±1,67 ^{#*} | 10,88±1,4 ^{#*} |
| Глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа | | | | |
| бк - контрольная группа (здоровые) | | 21,91 ± 1,11 | 23,81±0,79 | 25,10±1,01 |
| ба – алкоголизованные без коррекции | | 17,53 ± 1,11 [#] | 19,04 ± 1,12 [#] | 20,86 ± 2,11 [#] |
| После 30 дней метаболической коррекции | 1а | 15,76±1,12 [#] | 17,80±1,07 [#] | 15,11±3,6 [#] |
| | 2а | 38,13±3,07 ^{#*} | 38,97±2,73 ^{#*} | 47,04±3,1 ^{#*} |
| | 3а | 18,44±2,28 [#] | 21,93±3,09 ^{#*} | 22,52±2,77 ^{#*} |
| | 4а | 25,64±1,71 ^{#*} | 28,22±0,83 ^{#*} | 36,71±1,05 ^{#*} |
| Сукцинатдегидрогеназа | | | | |
| бк - контрольная группа (здоровые) | | 81,91 ± 1,11 | 73,81±0,79 | 75,10±1,01 |

| | | | | |
|--|----|------------------------|-----------------------|------------------------|
| ба – алкоголизи- рованные без коррекции | | $71,51 \pm 1,41^{\#}$ | $68,96 \pm 1,15^{\#}$ | $63,61 \pm 2,31^{\#}$ |
| После 30 дней метаболической коррекции | 1а | $78,76 \pm 1,12^{\#*}$ | $70,80 \pm 1,07^*$ | $75,11 \pm 3,62^*$ |
| | 2а | $75,13 \pm 3,07^{\#*}$ | $69,97 \pm 2,73^*$ | $70,04 \pm 3,19^{\#*}$ |
| | 3а | $75,44 \pm 2,28^{\#*}$ | $71,93 \pm 3,09^*$ | $76,52 \pm 2,77^*$ |
| | 4а | $71,64 \pm 1,71^{\#}$ | $67,22 \pm 0,83^{\#}$ | $62,71 \pm 1,05^{\#}$ |

Примечание:

$\#$ - статистически значимые различия, по сравнению с бк группой, $p < 0,05$;

* - статистически значимые различия, по сравнению с ба группой, $p < 0,05$.

У алкоголизованных животных до метаболической коррекции отмечалось статистически значимое снижение активности ЛДГ, Г-6-ФДГ и СДГ в тканях отделов мезокортиколимбической системы мозга, играющей ключевую роль в формировании алкогольной зависимости. Это свидетельствует о выраженных нарушениях углеводного метаболизма, энергетического обмена, снижении активности антиоксидантной системы и нарушении ГАМК-шунта, что приводит к нейромедиаторным нарушениям.

В отсутствие метаболической коррекции (4а группа) отмечен прирост активности Г-6-ФДГ от $17,1 \pm 0,7\%$ до $46,2 \pm 1,3\%$ выше контрольных значений ($p < 0,05$) в бк группе, что может косвенно свидетельствовать о напряжении процессов детоксикации в условиях оксидативного стресса. Поскольку единственной универсальной системой детоксикации радикалов жирных кислот, перекиси водорода и дикарбониллов является система глутатиона, нуждающегося в редукции за счет НАДФН₂, нарабатываемого Г-6-ФДГ. При этом сохранялись выраженные нарушения углеводного и энергетического обмена – активность ЛДГ и СДГ оставались на стабильно низком уровне.

Длительное принудительное питание раствором крахмала (1а группа) привело к восстановлению активности ЛДГ и СДГ до контрольных значений здоровых животных (бк группа), что говорит о возможной обратимости нарушений углеводного и энергетического обмена, нормализации

нейротрансмиссии ГАМК-эргической системы. Однако это не сопровождается компенсацией свободнорадикального окисления – активность Г-6-ФДГ оставалась ниже в среднем на $25,1 \pm 0,7\%$, по сравнению с показателями до коррекции ($p < 0,05$). Возможно, это могло быть связано с гликированием белков в условиях длительного питания крахмалом.

При 30-дневной коррекции раствором унитиола (2а группа) без коррекции гипогликемии сохранялись нарушения углеводного и энергетического обмена, активность ЛДГ ($p > 0,05$) и СДГ ($p > 0,05$) в различных отделах головного мозга статистически значимо не отличалась от показателей до коррекции. Однако была отмечена максимально выраженная положительная динамика в восстановлении активности Г-6-ФДГ ($p < 0,05$). Во всех изучаемых отделах мозга она даже превысила цифры своей активности в контрольной группе в 1,9 - 2,3 раза. Выявленная динамика активности ферментов могла отражать повышение потребности тканей мозга в НАДФН₂, обусловленной усилением прооксидантных процессов в патогенезе алкогольной интоксикации, а также подтверждает протекторный эффект унитиола в качестве донора сульфгидрильных групп. Этот факт позволяет рекомендовать включение данного вещества в схемы патогенетической метаболической коррекции в группе 3а с сочетанным использованием растворов крахмала и унитиола.

Подводя итоги данного этапа эксперимента, можно утверждать некоторые факты

1. Длительное, 30-дневное, усиленное питание алкоголизированных животных крахмалом, в сравнении с контрольными, способствует нормализации уровня глюкозы в крови, снижению выраженности кетоза, уменьшению влечения к этанолу и восстановлению гедонических свойств глюкозы.

2. У алкогользависимых крыс 4а группы, которые получали раствор 0,9 % NaCl, в условиях свободного выбора питья, не наблюдали нормализации ни одного из исследуемых параметров метаболизма до показателей здоровых животных.

3. Метаболическая коррекция раствором унитиола приводит к статистически значимому уменьшению проявления кетоза, что имеет кратковременный эффект.

4. Метаболическая коррекция раствором унитиола не способствует уменьшению гипогликемии и снижению влечения к алкоголю.

5. Длительное, 30-дневное усиленное углеводное питание способствует восстановлению способности потреблять глюкозу: алкоголизованным мозгом с $0,2 \pm 0,1$ ммоль / л до $0,6 \pm 0,2$ ммоль / л, а организмом в целом с $0,4 \pm 0,1$ ммоль / л до $0,5 \pm 0,1$ ммоль / л ($p < 0,001$). Этот эффект сохраняется и в отдаленном периоде, даже через 30 дней после окончания углеводной коррекции.

6. Нарушения углеводного и энергетического обмена в клетках головного мозга носят обратимый характер, что подтверждается восстановлением способности мозга утилизировать глюкозу как по результатам положительной динамики артериовенозной разницы по глюкозе, в условиях долговременной углеводной нагрузки, так и по результатам изучения активности ферментов в зонах мозга, отвечающих за формирование всех видов зависимостей

7. Восстановлению активности ЛДГ и СДГ до контрольных значений здоровых животных способствовало усиленное питание углеводами как изолированно (1а группа), так и в составе сочетанной коррекции (3а группа).

8. Восстановлению активности Г-6-ФДГ способствовало введение унитиола в виде изолированной (2а группа) или в составе сочетанной коррекции (3а группа).

Список публикаций по теме главы

1. Бортникова А.К., Панова Т.И., Казаков В.Н. Влияние уровня гликемии на потребление этанола и глюкозы алкогользависимыми крысами. – Университетская клиника. – 2013. – Т. 9, № 2. – С. 169-173.

2. Панова Т.И., Бортникова А.К. Роль кетоза в сохранении влечения к этанолу у алкогользависимых крыс. – Фундаментальные науки – медицине.

Материалы Международной научной конференции. Минск, 17 мая 2013 г. Ч. 2. – Минск: Беларуская навука. – С. 114-119.

2. Panova T.I., Bortnikova A.K., Goncharenko O.N. Stability of ketonuria at alcoholreliant rats. – В кн.: Досвід, реалії і перспективи розвитку систем охорони здоров'я. – Львів: Видавництво ЛОБФ «Медицина і право», 2013. – 585 с. – Р. 518-519.

1. Бортнікова Г.К. Потяг до етанолу у алкоголізованих щурів залежить від рівня глікемії та вираженості кетозу. – *Нейронауки: теоретичні та клінічні аспекти.* – 2013. – Т. 9, № 1-2. – С. 49-53.

2. Бортникова А.К., Панова Т.И. Влечение к этанолу у алкоголизованных крыс и уровень гликемии, выраженность кетоза. – *Лабораторная диагностика. Восточная Европа.* – 2014. – № 1 (9). – С. 52-61.

3. Бортникова А.К., Казаков В.Н., Панова Т.И. Снижение способности мозга алкогользависимых крыс утилизировать глюкозу. – *Архив клинической и экспериментальной медицины.* – 2013. – Т. 22, № 2. – С. 161-164.

4. Bortnikova A.K., Panova T.I. Peculiarities of Utilization of Glucose by Brain Tissues of Alcohol-Dependent Rats. – *Neurophysiology.* – 2014. – V. 46, Issue 3. – Р. 206-211.

5. Бортникова А.К., Панова Т.И.. Особенности утилизации глюкозы тканями мозга алкогользависимых крыс. – *Neurophysiology/ Нейрофизиология.* – 2014. – Т. 46, № 3. – С. 229-222.

6. Бортникова А.К., Панова Т.И. Влияние коррекции гликемии на восстановление утилизации глюкозы тканями мозга у алкогользависимых крыс. – *Университетская клиника.* – 2014. – Т. 10, № 1. – С. 9-15.

7. Панова Т.И., Бортникова А.К., Казаков В.Н., Ивнев Б.Б., Прокофьева Н.В., Андреева В.Ф., Коноплянко В.А., Снегирь А.Г., Шевченко Т.А., Гончаренко О., Филюшина Е. Компенсаторные возможности мозга алкогользависимых крыс утилизировать глюкозу. – 6 Конгрес Українського товариства нейронаук, Київ, 4-8 червня 2014 р. – С. 96.

8. Панова Т.И., Бортникова А.К., Казаков В.Н., Ивнев, Е.В Гайдарова, Андреева В.Ф., Коноплянко В.А., Снегирь А.Г., Шевченко Т.А., Гончаренко О., Филюшина Е. Возможность восстановления утилизации глюкозы мозгом алкогользависимых крыс. – Фізіологічний журнал. Матеріали ХІХ з'їзду Українського фізіологічного товариства ім. П.Г. Костюка з міжнародною участю, присвяченого 90-річчю від дня народження академіка П.Г. Костюка. – 2014. – Т. 60, № 3. Додаток. – С. 47-48.

9. Бортникова А.К. Влияние коррекции уровня кетонемии и гликемии на влечение к этанолу у крыс со сформированной алкогольной зависимостью // Архив клинической и экспериментальной медицины. - 2016. – Т.25, №1. – С. 35 - 39.

ГЛАВА 5

СУТОЧНЫЙ МОНИТОРИНГ КЕТОНУРИИ И ГЛИКЕМИИ У
АЛКОГОЛЬЗАВИСИМЫХ КРЫС

Необходимость проведения данного эксперимента – в формате суточного мониторинга – вытекает из результатов, полученных в предыдущих экспериментах. По данным результатов эксперимента с метаболической коррекцией, длительное, в течение 30 дней, подавление кетоза унитиолом (2а группа) в результате не только не уменьшало, но даже увеличило потребление этанола. Так сформировалась предпосылка рабочей гипотезы о возможном наличии связи между степенью кетоацидоза и степенью влечения к алкоголю. Поэтому возникла необходимость провести более подробный мониторинг (трехдневный с шагом в один час) степени кетоза и степени влечения к алкоголю, в условиях искусственного моделирования уровня кетоза. В этой модели эксперимента причинно-следственное взаимодействие выглядит так: уровень кетоза – это параметр, который задается, а степень влечения к алкоголю – это производная величина, которая зависит от уровня кетоза. Параллельно каждый час мы измеряли уровень гликемии и рассчитывали содержание этанола в крови.

После принудительной алкоголизации на втором этапе эксперимента животным 5а один раз, вечером, в 17.00 ч per os вводили унитиол. У животных этой группы, в условиях свободного выбора питья, предоставляемого с 9.00 до 17.00, количество выпитого алкоголя оставалось примерно таким же, как по окончании принудительной алкоголизации: $6,8 \pm 1,3$ мл / 0,1 кг / сут против $6,3 \pm 1,4$ мл / 0,1 кг / сут ($p > 0,05$) (Приложение 9, таблица 9.1), несмотря на то, что на этом этапе животные потребляли еще и воду. За счет потребления воды общее суточное количество питья (вода + алкоголь) возросло до $7,1 \pm 0,7$ мл / 0,1 кг / сут.

При этом больше всего алкоголя, практически третью часть всей дневной нормы, животные экспериментальной группы 5а потребляли всего за один час: с 9.00 ч до 10.00 ч, то есть в первый час после возвращения поилки с этанолом в

клетку. Среднее потребление алкоголя в этот час составило $2,4 \pm 0,3$ мл / 100 г веса мл – против $6,8 \pm 1,4$ мл / 100 г веса за целый день ($p < 0,01$) (рисунок 17). Очевидно, что такое обильное питье алкоголя в этот час не могло быть спровоцировано накопившейся жаждой, поскольку всю ночь в клетках находилась чистая питьевая вода.

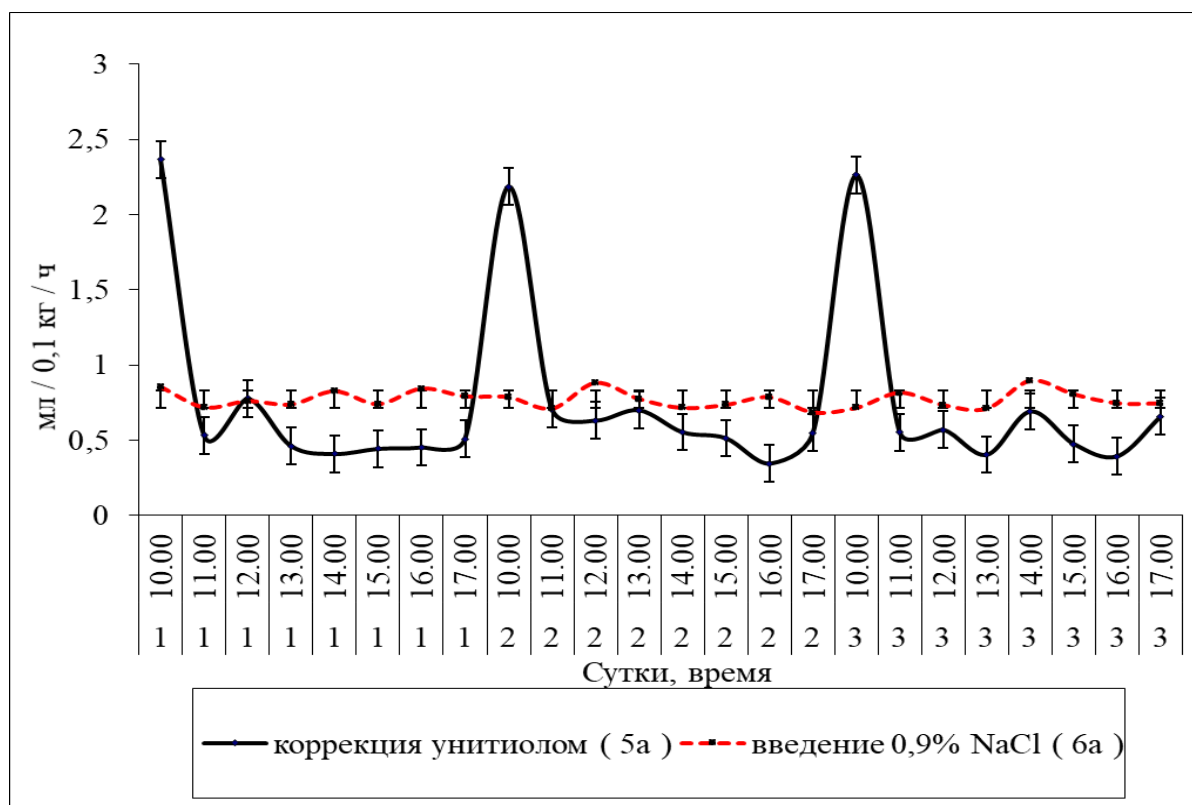


Рисунок 17. Почасовая динамика потребления алкоголя крысами 5а и 6а групп в трехдневном эксперименте

В последующие 7 часов, с 10.00 ч до 17.00 ч, количество потребленного алкоголя в час оставалось примерно одинаковым, на уровне $0,6 \pm 0,3$ мл / 0,1 кг / час, с незначительными флуктуациями.

Уровень кетонурии у животных экспериментальной 5а группы был минимальным утром, в 9.00 ч: у восьми крыс кетонов в моче вообще не было: «-», у двух животных концентрация минимальна (до 0,5 ммоль / л): «±». Очевидно, что такое снижение уровня кетонурии происходило под влиянием унитиола, введенного накануне вечером. Это ожидаемый результат: согласно инструкции, препарат унитиола имеет пролонгированное действие-до 8 часов [6, 22].

Снижение было разной степени выраженности: чаще всего на три пункта (у девяти крыс), иногда на два пункта (у одной крысы).

Но по возвращении поилки с алкоголем в клетку и потребления этого алкоголя крысами количество кетоновых тел росло. Максимальное увеличение наблюдалось в 10.00 ч и 11.00 ч, то есть после максимального потребления алкоголя. Прирост кетонурии за один час, с 9.00 ч до 10.00 ч, составил один пункт (у восьми крыс) или даже два пункта (у двух крыс). Прирост с 10.00 ч до 11.00 ч был тоже существенным: на один пункт (у шести крыс) и два пункта (у четырех крыс). Прирост с 11.00 ч до 12.00 ч был минимален: у трех крыс – на один пункт, а у семи крыс – прироста не было. А затем, в течение последующих часов дня, прироста кетонурии не наблюдалось ни у одной крысы (Приложение 14, таблица 14.1).

Изменения у животных ба группы, не получавших унитиол, были следующими. Количество выпитого алкоголя на втором этапе, в условиях свободного выбора, не изменилась и было таким же, как и сразу по окончании принудительной алкоголизации: $6,1 \pm 0,3$ мл / 0,1 кг / сут против $6,3 \pm 0,2$ мл / 0,1 кг / сут ($p > 0,05$). В течение дня потребление алкоголя было примерно равномерным: различия между показателями в отдельные часы статистически незначимы ($p > 0,05$).

Уровень кетонурии в течение дня у крыс ба группы был постоянным. Показательно, что у трех крыс ба группы, как и у крыс 5а группы, в 9.00 ч кетонурия была меньше, чем в другие часы, но всего на один пункт (а не на два-три пункта, как в 5а группе). Но уже через час после возвращения поилки с алкоголем в клетку, то есть в 10.00 ч, кетонурия у этих трех животных увеличивалась на один пункт и сохранялась на таком уровне в течение всего следующего дня

Уровень гликемии колебался в течение суток у крыс обеих групп, 5а и ба. У экспериментальных животных 5а группы, которые вечером получали унитиол, утром, в 9.00 ч, содержание глюкозы в крови было на уровне $2,8 \pm 0,6$ ммоль/л. Затем, после употребления большой дозы алкоголя ($2,4 \pm 0,3$ мл / 100 г) за один час

(с 9.00 ч до 10.00 ч), содержание глюкозы резко упало до отметки $2,3 \pm 0,6$ ммоль / л ($p < 0,005$). А потом, несмотря на то, что потребление алкоголя продолжало оставаться на высоком уровне, уровень гликемии очень быстро восстановился в течение только одного часа и достигал отметки $2,7 \pm 0,7$ ммоль/л уже к 11.00 ч (таблица. 9). Это указывает на то, что этанол, как инициирующий фактор, только запускает развитие гипогликемии (действие функциональной системы «по возмущению»), но мощность регуляторных механизмов организма настолько велика, что в дальнейшем они способны восстановить константу гликемии, несмотря на то, что фактор, который ее вызвал, продолжает действовать на организм (действие системы «по отклонению»).

Таблица 9

Почасовая динамика уровня гликемии в крови крыс 5а и 6а групп в трехдневном эксперименте

| Время регистрации | Уровень гликемии, ммоль / л | |
|-------------------|-----------------------------|-------------------|
| | 5а группа, n = 10 | 6а группа, n = 10 |
| 9.00 | $2,8 \pm 0,6$ | $3,0 \pm 0,7$ |
| 10.00 | $2,3 \pm 0,6$ * | $2,8 \pm 0,7$ * |
| 11.00 | $2,7 \pm 0,7$ | $2,9 \pm 0,7$ |
| 12.00 | $2,8 \pm 0,7$ | $3,1 \pm 0,7$ |
| 13.00 | $2,8 \pm 0,7$ | $3,2 \pm 0,6$ |
| 14.00 | $3,0 \pm 0,9$ | $3,3 \pm 0,6$ |
| 15.00 | $3,0 \pm 0,9$ | $3,4 \pm 0,6$ |
| 16.00 | $3,1 \pm 0,8$ | $3,4 \pm 0,6$ |
| 17.00 | $3,2 \pm 0,8$ | $3,5 \pm 0,6$ * |

Примечание: *- статистически значимые отличия внутри одной группы, по сравнению с показателем на 09.00, $p < 0,005$

Надо иметь в виду, что такое значительное снижение гликемии произошло, несмотря на постоянное периодическое употребление животными пищи

(кормушки с пищей оставались в клетках, доступ к ним был свободен). То есть можно предположить, что, если бы крысы были натошак, то гипогликемия, спровоцированная употреблением алкоголя, была бы еще значительнее.

В течение дня уровень гликемии понемногу подрастал, достигая в 16.00-17.00 ч максимальной отметки – $3,2 \pm 0,8$ ммоль/л. И хотя в течение 5 часов (с 11.00 ч до 16.00 ч) гликемия в предыдущий час не отличалась статистически значимо от следующего часа, но все же между гликемией в 11.00 ч и гликемией в 17.00 ч зафиксировали статистически значимую разницу ($p < 0,005$). Очевидно, это колебание физиологическое, обусловленное характером суточного потребления пищи и всасывания глюкозы из желудочно-кишечного тракта.

У животных ба группы динамика гликемии была схожей, разница заключалась лишь в степени выраженности гликемии. Утром, в 9.00 ч содержание глюкозы регистрировался также на уровне $3,0 \pm 0,7$ ммоль/л. Затем, после потребления менее значительных, чем в 5а группе, доз алкоголя ($0,8 \pm 0,6$ мл / 0,1 кг) за один час (с 9.00 ч до 10.00 ч), содержание глюкозы падало до отметки $2,8 \pm 0,7$ ммоль/л ($p < 0,005$), но менее значительно, чем у экспериментальных крыс 5а группы. Потом уровень гликемии так же быстро, буквально за один час, восстанавливался до отметки $2,9 \pm 0,7$ ммоль/л. Причем у крыс ба группы эти колебания носят лишь описательный характер, ибо не имели статистически значимого различия ($p > 0,005$). Но, несмотря на отсутствие статистически подтвержденной разницы, нужно акцентировать на этих изменениях внимание, потому что, вероятно, это указывает на то, что быстрый внезапный скачок гликемии вниз спровоцирован именно приемом алкоголя, а не какими-то другими факторами. И чем больше эта доза алкоголя, тем более выражено уменьшение глюкозы в крови. Ведь крысы ба группы потребляли алкоголь в первый утренний час (с 9.00 ч до 10.00 ч) значительно в меньшем количестве, чем крысы группы 5а ($0,8 \pm 0,6$ мл / 0,1 кг / час против $2,4 \pm 0,6$ мл / 0,1 кг / час). Очевидно, снижение гликемии спровоцировано угнетением глюконеогенеза и гликогенолиза. С небольшими флуктуациями от $3,1 \pm 0,7$ ммоль / л до $3,4 \pm 0,6$ ммоль / л, уровень гликемии у крыс ба группы удерживался в период с 12.00 ч до 16.00 ч. И только в

16.00-17.00 ч, на фоне постоянного периодического потребления пищи в течение дня, уровень гликемии вырос настолько ($3,5 \pm 0,6$ ммоль/л), что статистически значимо ($p < 0,005$) отличался от утреннего значения в 9.00 ч.

Содержание этанола в крови не всегда стопроцентно совпадает с потреблением алкоголя. Это зависит от того, что скорость его поступления в кровь и скорость элиминации неодинаковы. Видно, что кратковременные, в пределах суток, изменения уровня гликемии зависят не столько от уровня этанола в крови, а от самого факта потребления определенных доз алкоголя. Чем более резко меняется содержание этанола, тем более резко меняется содержание глюкозы. Затем регуляторные механизмы выравнивают содержание глюкозы до отметки константы. Другое дело, что величина константы для здорового и алкогользависимого организма различна. Если для здорового организма это $7,5 \pm 0,7$ ммоль/л, то для алкогользависимого это $3,0 \pm 0,7$ ммоль/л.

А вот уровень кетоза в большей степени зависит именно от уровня этанола в крови, который циркулирует именно в этот момент. Очевидно, причина в том, что механизмы регуляции нормального содержания кетоновых тел в крови более медленные, чем механизмы регуляции гликемии. Поэтому функционируют преимущественно по принципу «по отклонению», а не «по возмущению». Хотя, конечно же, регуляция «по возмущению» (в нашем случае – по потреблению больших доз алкоголя) также осуществляется.

Подвергнем анализу полученные результаты. Мы видим, что уровень кетонурии у алкоголизованных животных не сохраняется в течение суток на постоянном уровне, но меняется очень быстро. Есть основания полагать, что степень кетонурии у крысы отражает степень кетонемии в течение последних максимум 30 минут. После обильного потребления алкоголя в утренние часы уровень кетоновых тел в крови менялся очень быстро, в течение не более одного часа. А поскольку кетоновые тела не задерживаются в периферическом кровотоке надолго (циркулируют всего несколько минут, а затем быстро или поглощаются тканями, или выводятся почками в мочу), нигде не депонируются в организме, то

становится понятным, что их резкие, быстрые колебания в течение суток вызваны изменением скорости их продукции.

Производство кетоновых тел, как говорилось выше, осуществляется в печени двумя путями: или из свободных жирных кислот в ходе их неполного окисления, или из ацил-КоА, образующегося в избытке и не утилизирующегося в цикле трикарбоновых кислот.

Первый путь более инертен, требует времени, так как утилизация триглицеридов из жирового депо, с расщеплением их до свободных жирных кислот, начинается не сразу, инициируется недостатком в организме «топливных» молекул глюкозы. Второй путь более лабильный и быстрый, потому что зависит только от мгновенной ситуации, сложившейся в данный момент в гепатоците, а именно: от количества ацетил-КоА, из которого синтезируются кетоновые тела. Избыток же ацетил-КоА после приема алкоголя создается в гепатоците по двум причинам. Во-первых, сама молекула этанола метаболизирует сначала до ацетальдегида, а затем до ацетил-КоА. Во-вторых, фермент алкогольдегидрогеназа, которая метаболизирует этанол, в качестве кофермента активно использует НАД, поэтому соотношение НАД / НАДН смещается в сторону НАДН, дефицит же НАД приводит к снижению активности ферментов, которые используют как кофермент. Такими ферментами являются ферменты цикла трикарбоновых кислот. Поэтому ацетил-КоА не может полностью утилизироваться в цикле Кребса, но используется для построения кетоновых тел.

С учетом вышесказанного, есть основания полагать, что в данном эксперименте виденное нами быстрое наполнение кровотока кетоновыми телами после употребления алкоголя крысами было инициировано именно алкоголем, а не гипогликемией, которая при алкоголизме достаточно стабильная. В пользу этого предположения говорит и сопоставление фармакодинамики унитиола. Согласно инструкции производителя, действие унитиола заканчивается уже через 8 часов [22]. В эксперименте же наблюдался крайне низкий уровень кетоновых тел (или даже полное их отсутствие) намного дольше – и через 16 часов после введения унитиола. Рост кетоза начинался только после 9.00 ч, то есть после

приема больших доз алкоголя. Это свидетельствует, что пусковым стимулом для быстрой продукции кетоновых тел служил именно этанол, а не гипогликемия (которая была и ночью). При этом стабильности уровня гликемии способствовало постоянное нахождение кормушек с зерном в клетках: на ночь их не убрали, то есть не провоцировали острый голод и усиление гипогликемии.

Итак, в причинно-следственных отношениях патогенеза алкоголизма этанол является причиной, а гипогликемия и кетоз – последствиями. Цепочка событий такова: ввиду длительной гипогликемии, клетки алкоголизированного организма претерпевают глубокие перестройки ферментативных систем и переходят на питание кетоновыми телами, которые становятся главными топливными молекулами. Образование кетоновых тел стимулируется этанолом.

Следовательно, как здоровый организм зависит от главного питательного субстрата – глюкозы, так и алкоголизированный организм зависит от главного энергетического субстрата при гипогликемии – кетоновых тел. В здоровом организме при снижении концентрации глюкозы в крови возникает ощущение голода, а в алкоголизированном организме при снижении уровня кетоновых тел в крови возникает чувство тоже своего рода голода. Но поскольку образование кетоновых тел стимулируется большими дозами этанола, то отличительной особенностью голода алкоголика становится влечение не к традиционной пище (как имточнику глюкозы), а к алкоголю (как источнику кетоновых тел). В итоге, на определенной стадии алкоголизма устойчивого влечения к этанолу можно рассматривать уже как следствие гипокетонемии.

Проанализируем результаты эксперимента, обсуждаемого в данном разделе.

1) Искусственное подавление кетоновых тел уже через 16 ч приводило к увеличению потребления алкоголя в 3 раза (экспериментальные крысы с 9.00 ч до 10.00 выпивали $2,4 \pm 0,6$ мл / 0,1 кг, а контрольные крысы в это же время – всего $0,8 \pm 0,6$ мл / 0,1 кг).

2) Больше всего алкоголя (более трети суточной нормы) животные выпивали на фоне самого низкого уровня кетоза: с 9.00 ч до 10.00 ч.

3) Потребление большого количества алкоголя (с 9.00 ч до 10.00 ч) приводило уже через один-два часа до максимального роста уровня кетонурии (до 1,5-10,0 ммоль / л).

4) после максимального роста уровня кетоза (до 11.00 ч) потребление этанола уменьшалось.

5) Стабильный уровень кетонурии сопровождался стабильным, равномерным потреблением алкоголя.

6) Потребление большого количества алкоголя (с 9.00 ч до 10.00 ч) приводило к кратковременному, в течение только одного часа, снижению гликемии; затем гликемия восстанавливалась и оставалась стабильной, несмотря на продолжающееся употребление алкоголя.

Указанные факты позволяют утверждать:

- наличие причинно-следственных отношений между двумя процессами: уровнем алкогольного кетоза и уровнем влечения к алкоголю. Причем эти величины обратно пропорциональны друг другу: чем ниже уровень кетоза, тем выше влечение к алкоголю;

- длительное подавление кетонемии не просто повышает, а даже провоцирует влечение к алкоголю и является его непосредственной причиной.

Список научных публикаций по теме главы

1. Панова Т.И., Бортникова А.К. Связь кетонурии и влечения к алкоголю у алкогользависимых крыс, по итогам суточного мониторинга. – *Neurophysiology/ Нейрофизиология.* – 2015. – Т. 47, №. – С.

2. Бортникова А.К., Панова Т.И. Суточный мониторинг содержания кетоновых тел у алкогользависимых крыс. – *Архів клінічної та експериментальної медицини.* – 2014. – Т. 23, № 2. – С. 138-143.

3. Панова Т.И., Бортникова А.К. Уровень кетонемии как фактор, определяющий аддиктивное поведение алкоголизированных крыс // *Neurophysiology / Нейрофизиология.* – 2016. – Т. 48, №4. – С. 279-285.

4. Panova T.I., Bortnikova A.K. Ketosis Level as a Factor Determining Addictive Behavior of Alcoholized Rats. // *Neurophysiology*.– 2016.– 48(4).– P. 252-258.

5. Аджамян В.С., Бортникова А.К. Нейрофизиологические основы патологических влечений // *Материалы 78-го международного Медицинского конгресса молодых ученых «Актуальные проблемы теоретической и клинической медицины» – Донецк, 2016. – С. 71-72.*

АНАЛИЗ И ОБОБЩЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ

Итак, кратко перечислим основные находки, которые мы выяснили в ходе этой работы:

1. 4-месячная алкоголизация крыс приводит к гипогликемии, кетонурии.
2. Алкогользависимые крысы перестают добровольно употреблять глюкозу, даже на фоне выраженной хронической гипогликемии, то есть для них сладости теряют свои гедонические свойства.
3. Алкогользависимый мозг "отказывается" потреблять глюкозу, даже при условии ее достаточного количества в крови (определено по артериовенозной разнице).
4. В ходе длительной алкоголизации происходит снижение активности ключевых ферментов гликолиза и энергетического обмена (ЛДГ, Г-6-ФДГ, СДГ) в структурах мезокортиколимбической системы.
5. Чем продолжительнее и больше потребление алкоголя, тем меньше потребление глюкозы.
6. Длительное (15-часовое) отмены алкоголя в алкогользалежных крыс приводит к снижению содержания кетоновых тел в моче/крови.
7. Максимальное потребление алкоголя наблюдается в первый час после предоставления свободного доступа к поилкам с этанолом после предварительного принудительного 15-часового воздержания от алкоголя.
8. Потребление больших доз алкоголя приводит к росту уровня кетоновых тел в течение 1-3 часов. После этого уровень кетонов остается стабильно высоким в течение целого дня.
9. После восстановления высокого уровня кетоновых тел в крови потребления алкоголя уменьшается.
10. Потребление больших доз алкоголя приводит к резкому кратковременному падению уровня гликемии, который быстро восстанавливается в течение одного часа. Дальнейшее продолжающееся потребление алкоголя в течение дня уже не влияет на уровень гликемии.

11. Длительная коррекция унитиолом не уменьшает влечение к алкоголю. При этом уровень кетонемии уменьшается, а уровень гликемии не меняется и остается стабильно низким.

12. Длительная коррекция унитиолом приводит к максимально выраженной положительной динамике в восстановлении активности Г-6-ФДГ, что может отражать повышение потребности тканей мозга в НАДФН₂, обусловленной усилением прооксидантных процессов в патогенезе алкогольной интоксикации, а также подтверждает протекторный эффект унитиола в качестве донора сульфгидрильных групп.

13. Принудительное усиленное кормление углеводной пищей способствует уменьшению влечения к алкоголю. При этом уровень гликемии повышается, а уровень кетонемии уменьшается. Способность мозга утилизировать глюкозу повышается – повышается АВР для мозга и активность ЛДГ и СДГ, что отражает восстановление активности гликолитических ферментов и энергетического обмена в клетках.

14. Взаимосвязь между уровнями кетоза и гликемии зависит от длины временного интервала, в течение которого их изучают:

- на большом промежутке времени, в течение четырех месяцев, в ходе формирования алкогольной зависимости, степень кетоза обратно пропорциональна степени гликемии: чем ниже гликемия, тем выше кетоз;

- в течение одного дня выраженность кетоза и уровень гликемии меньше связаны: кетоз нарастает в зависимости от потребления алкоголя, а гликемия остается стабильной.

15. При сформированной алкогольной зависимости и стабильной гипогликемии:

- между содержанием этанола в крови и уровнем кетонемии – прямо пропорциональная зависимость: чем меньше этанола, тем ниже уровень кетоновых тел;

- между уровнем кетоновых тел и влечением к алкоголю – обратно пропорциональная зависимость: чем меньше кетоновых тел, тем выше желание употребить алкоголь.

На основании интеграции этих находок была сформулирована такая концепция. На самом деле, так называемая алкогольная зависимость – это зависимость не от алкоголя самого по себе, а зависимость от кетоновых тел, содержание которых резко возрастает именно под влиянием алкоголя. Хорошо известно, что при хроническом алкоголизме развивается такая классическая цепь событий: хроническая гипогликемия → энергетическое голодание мозга → стимуляция образования кетоновых тел → переход мозга с питания глюкозой на питание кетоновыми телами.

Мы же предлагаем продолжить эту цепочку, добавив сюда еще несколько звеньев: → мозг становится зависимым от кетоновых тел, как питательного субстрата, потому что теряет способность утилизировать глюкозу → поэтому при снижении уровня кетоза → возникает энергетическое голодание → возникает биологическая необходимость пополнить количество кетоновых тел, а не глюкозы → так возникает желание употребить этанол, который является источником кетоновых тел и инициирует их синтез.

Другими словами, точно так же, как здоровый мозг в норме «зависит» от глюкозы, точно так же мозг алкогользависимого организма зависит от кетоновых тел, как источника питания. Питание кетоновыми телами становится витальной потребностью. Голод запускает поведение, направленное на поиск и прием пищи. И точно так же, как голод в здоровом мозге запускает витальную поведенческую реакцию, направленную на поиск и прием пищи, точно так же голод в алкоголизированном мозге запускает витальную поведенческую реакцию, направленную на поиск и прием алкоголя (читай: кетоновых тел).

Эта сформированная гипотеза лежит в одной плоскости с гипотезой об аллостазе, которая предложена G.F. Кооб [162]. Если гомеостаз является саморегулирующейся системой, которая поддерживает стабильность нормальных параметров системы, то аллостаз (в отличие от гомеостаза) поддерживает

стабильность, которая возникла в результате аномальных изменений внутри гомеостазной системы [135]. Аллостаза – это непрерывный и динамический процесс приспособления системы к новым, аномальным, условиям [162]. Аллостаза является заменой гомеостаза. G.F. Кооб использовал понятие аллостаза для объяснения нарушения гомеостазной регуляции эмоционального статуса. В нашем случае наблюдалось то же самое явление – формирование аллостаза – только не для эмоционального, а для метаболического статуса.

По теории П. К. Анохина, для поддержания любой константы гомеостаза, как регулируемого параметра, организуется функциональная система, которая является динамической и включает следящее устройство, управляющее устройство, исполнительные органы.

Контур регуляции гликемии является контуром нервной регуляции, то есть следящее устройство (глюкорцепторы) отнесены на значительное расстояние от управляющего устройства (ЦНС). А контур регуляции кетонемии имеет признаки гуморальной регуляции, то есть следящее устройство объединено с управляющим устройством. Мы предполагаем, что роль следящего устройства могут выполнять нервные клетки ЦНС в которых изменяется внутриклеточный метаболизм.

Оба контура имеют два звена канала прямой связи: внутреннее и внешнее. В контуре поддержания гликемии внутренним звеном является поддержание гликемии на устойчивом уровне за счет внутренних резервов: глюконеогенеза, гликогенолиза. Внешним звеном является поведение, которое направлено на поиск и прием пищи (как поставщика глюкозы). В контуре поддержания кетонемии внутренним звеном может быть поддержание кетонемии на постоянном уровне за счет внутренних резервов: распада триглицеридов в жировой ткани и окисления жирных кислот в печени до кетоновых тел. Внешним звеном является поведение, которое направлено на поиск и прием алкоголя (но не как поставщика кетоновых тел, а как стимулятора их образования).

Учитывая вышеизложенное, вытекает нецелесообразность подавлять кетоз при некоторых патологических состояниях, которые сопровождают алкогольную болезнь. Речь идет, прежде всего, о состоянии острого алкогольного отравления.

Традиционно считается, что коматозное состояние при остром алкогольном отравлении спровоцировано тремя факторами: 1) токсическим действием этанола и его метаболита ацетальдегида на мозг, 2) кетоацидозом, 3) гипогликемией. Поэтому классические схемы купирования этого состояния включают быструю агрессивную нейтрализацию кетоновых тел [22, 213] и немедленное внутривенное введение 5 % растворов глюкозы [90, 154, 168, 213]. Однако, с учетом полученных данных, на первое место выходит преодоление лишь ацидоза (например бикарбонатами). А коррекцию кетоза унитиолом следует обязательно дополнять восстановлением уровня гликемии. Изолированное введение унитиола приведет к снижению уровня кетоновых тел, обладающих полезной энергетической функцией, и усугубит энергетическое голодание тканей организма. Ведь о кетоновые тела, достигнув концентрации лишь 5 ммоль/л, поставляют в мозг примерно 50% субстратов, которые нужны для производства АТФ.

В этом наша концепция отличается от традиционной. Принято рассматривать кетоацидоз в целом как вредное явление [142, 176, 243]. Мы же предлагаем различать составляющие кетоацидоза на кетоз и ацидоз: негативный характер для организма носит лишь ацидоз, а кетоз является полезной приспособительной реакцией. То есть вредной являются не сами молекулы кетоновых тел (гидроксибутирата, ацетоацетата), а протоны, которые образуются параллельно в большом количестве. Хотя, к сожалению, биохимия этого процесса такова, что образование кетоновых тел в печени обязательно сопровождается образованием большого количества свободных ионов водорода [3]. Негативное влияние протонов начинается, когда уровень кетокислот в крови начинает превышать буферную емкость крови. Это-примерно 10 ммоль / л.

Отметим, что в научной литературе мы встретили только одну работу, где авторы также ставят вопрос о потенциальных терапевтических преимуществах высоких концентраций ацетата – так называемых кетогенных диет для алкоголиков [54]. Эти авторы обнаружили, что алкогольная интоксикация значительно уменьшает в различных структурах мозга метаболизм глюкозы

(показано по активности фермента фосфогидрогеназы), но значительно повышает поглощение ацетата. Причем количество поглощенного ацетата положительно связано с количеством выпитого алкоголя ($r = 0,66$, $p < 0,01$). Чрезвычайно важно зафиксировать, что у хронических алкоголиков поглощение ацетата выше, чем при случайном употреблении алкоголя, что как раз и свидетельствует об адаптации алкоголизированного мозга к ацетату, как к альтернативному топливу [54]. Этот факт подтверждает вывод, к которому и мы пришли в этой работе. В пользу кетогенных диет при алкогольной гипогликемии говорит еще и тот факт, что кетоновый метаболизм использует меньшее количество кислорода, а следовательно, способствует уменьшению производства свободных радикалов, которые являются повреждающими факторами для тканей.

О том, что между приемом алкоголя и выработкой больших количеств кетоновых тел должно пройти несколько времени, может свидетельствовать тот факт, что к моменту, когда после приема алкоголя в организме наконец развивается выраженный кетоацидоз, содержание этанола в крови уже чаще всего или совсем отсутствует, либо очень низкое (менее 10 мг/дл) [115, 212]. Более того, развивающаяся потеря сознания на фоне отсутствия кетоновых тел свидетельствует, что токсический эффект обусловлен в большей степени непосредственно этанолом и его метаболитом ацетальдегидом, а не кетоновыми телами. Поэтому мы предлагаем посмотреть с другой точки зрения на патогенез комы при остром алкогольном отравлении. Критическое снижение функционирования мозга может быть вызвано острым энергетическим голодом, потому что не успели образоваться значительные количества кетоновых тел.

Отсюда видны не только возможные причины алкогольного отравления, но и причина наступления момента алкогольной абстиненции. Очевидно, этот момент наступает, когда уровень кетоновых тел достигает самой низкой отметки (или вовсе отсутствуют), что провоцирует острый энергетический голод мозга. Это обуславливает нарушения работы ЦНС, приводящие к характерным психо-эмоциональным, соматическим, вегетативным расстройствам.

Мы показали, что степень кетоза может свидетельствовать о давности употребления алкоголя: чем длительнее период воздержания от алкоголя, тем менее выражен кетоз. Соответственно, наибольшая выраженность кетоза наблюдается через 1-2 часа после употребления алкоголя.

Требуют анализа и установленные экспериментально факты относительно значения глюкозы для алкоголизируемого организма. С одной стороны, мы обнаружили, что между гликемией и кетозом существует обратная связь: чем ниже уровень гликемии, тем более выражен кетоз [6]. Это легко объясняется физиологической целесообразностью: ведь в условиях гипогликемии организм требует хотя бы какого-то альтернативного энергетического субстрата.

Но, с другой стороны, мы обнаружили, на первый взгляд, вроде бы парадоксальную ситуацию: алкоголизируемый мозг, который существует в условиях хронического дефицита глюкозы, «отказывается» от потребления глюкозы, даже при условии ее достаточного наполнения в крови [7]. О "ненужности" глюкозы свидетельствует и потеря ее гедонических свойств для алкоголизируемых крыс [5]. Для алкогользависимого мозга константа гликемии уже не является важной. Этот наш вывод совершенно совпадает с положениями гипотезы о зависимости [162]. Эта гипотеза алкогольной зависимости объясняет нарушение механизма гомеостазной регуляции эмоционального статуса в условиях нерегулируемого (компульсивного) употребление алкоголя и замену этого механизма новым, аллостазным механизмом.

Подтверждением неспособности алкоголизируемого мозга утилизировать глюкозу являются результаты гистоэнзимологического исследования структур мезокортиколимбической системы, отражающие нарушение активности ферментов гликолиза и энергетического обмена в клетках мозга. Это созвучно с результатами других исследователей, которые показали с помощью ПЭТ, что алкогольная интоксикация значительно уменьшает метаболизм глюкозы (показано по активности фермента фосфогидрогеназы), но значительно повышает поглощение ацетата [54].

Об «отказе» алкоголизируемого мозга от глюкозы в пользу других топливных молекул могут свидетельствовать и результаты такого эксперимента. Алкоголизируемым и контрольным крысам в одинаковых дозах внутривенно вводили этанол с радиоактивно помеченным атомом углерода: $[2(13)C]$. Затем с использованием магнитно-резонансной спектроскопии обнаружили, что в тканях мозга алкоголизируемых крыс значительно больше, чем у контрольных животных, молекул, в состав которых входил замеченный углерод. Меченый углерод был в составе молекул ацетата, а также молекул, которые образуются из альфа-кетоглутарата (промежуточного вещества ЦТК): глутамата, глутамина, ГАМК. Это свидетельствует о том, что в алкоголизируемом мозге возрастает поглощение и окисление циркулирующего ацетата. Так проявляется адаптация клеток мозга к использованию в качестве альтернативных топливных молекул продуктов метаболизма этанола – ацетата. Авторы выдвигают предположение, что такая перестройка на утилизацию ацетата алкогольного происхождения способствует алкогольной зависимости (к такому же выводу пришли и мы). Также в этой работе обнаружено, что клетки астроглии поглощают только ацетат, а клетки других разновидностей глии и нейроны могут поглощать не только ацетат, но и непосредственно этанол. В таком случае дальнейшее превращение этанола проходит непосредственно в клетках мозга [178].

Не только в условиях гипогликемии, но и в условиях гипергликемии константа гомеостаза гликемии точно так же очень долго не сдвигается и удерживается на постоянном уровне. Вспомним, что в нашем эксперименте здоровые крысы в течение длительного времени (30 дней) получали насильственное усиленное углеводное кормление. Но ни константа гликемии, ни утилизация глюкозы мозгом (артериовенозная разница по глюкозе) не изменились. Это лишний раз свидетельствует о чрезвычайно мощных компенсаторных механизмах поддержания констант гомеостаза на устойчивом уровне в здоровом организме.

Наконец добавим несколько соображений относительно возможных механизмов, лежащих в основе полученного нами положительного влияния

усиленного питания на угнетение влечения к алкоголю и восстановление активности ферментативных систем утилизации глюкозы. Но для этого должна активироваться система транскрипции соответствующих генов. При алкоголизме транскрипция этих генов является подавленной. Но эпигенетические изменения (в отличие от генетических) не носят постоянного характера «навсегда». Доказано, что патологический процесс деацетилирования «хвостов» гистонов и деметилирования ДНК может иметь обратный характер [17, 120]. В таком случае восстанавливается нормальный процесс транскрипции. Какие же факторы способствуют деацетилированию? Эпигенетические изменения могут быть вызваны практически любыми молекулами: питательными, метаболитами, ионами. Это касается как экзогенных молекул, принятых через желудочно-кишечный тракт, так и эндогенных молекул, которые образуются в результате процессов деполяризации мембран, обычной рабочей активности нейронов во время мышления, прослушивания, восприятия информации [17, 223]. Так что обратимость эпигенетических изменений дает надежду на обратимость метаболических процессов в клетках мозга и устранение выраженного влечения к этанолу в период ремиссии.

Таким образом, алкогольная зависимость – это острая потребность на фоне хронической гипогликемии в единственном альтернативном энергосубстрате – кетоновых телах, формируемых гепатоцитами из метаболитов этанола. Длительная гипогликемия, окислительный и дикарбонильный стресс, формирующиеся при хроническом алкоголизме, приводят к нарушениям углеводного и энергетического обмена в тканях головного мозга, наиболее выраженным в префронтальной коре, миндалевидном теле и прилежащем ядре. В условиях энергетического голодания мозга происходит перестройка внутриклеточного метаболизма нервной ткани – переход с потребления глюкозы на альтернативный энергетический субстрат – кетоновые тела. Ввиду снижения способности утилизировать глюкозу, мозг становится зависимым от кетоновых тел, как от энергетического субстрата, поэтому в случае прекращения потребления этанола возникает энергетическое голодание вследствие снижения

уровня кетоза, что приводит к формированию биологической мотивации восполнить экзогенный пул кетоновых тел (этанол), а не глюкозы. Питание кетоновыми телами становится витальной потребностью (рисунок 8).



Рисунок 18. Схема патогенетических механизмов формирования стойкого влечения к этанолу при длительной алкоголизации

Схемы купирования абстинентного синдрома могут включать усиленную нейтрализацию кетоновых тел. Учитывая вышеизложенное, вытекает нецелесообразность подавления кетоза без коррекции углеводного обмена при патологических состояниях, сопровождающих хронический алкоголизм. С учетом полученных в ходе данного исследования данных, коррекция выраженности кетоза (унитиолом) может провоцировать энергетическое голодание головного мозга и усиливать влечение к этанолу. А введение в схему лечения патогенетически обусловленной длительной метаболической коррекцией гликемии позволит нормализовать углеводный и энергетический обмен тканей головного мозга, восстановить нейромедиаторный обмен и уменьшить степень влечения к этанолу в долгосрочном периоде.

ВЫВОДЫ

В диссертационной работе на основании полученных в эксперименте результатов физиологического, патофизиологического, биохимических, гистоэнзимологического и статистического методов исследования автором решена актуальная научная задача патологической физиологии - уточнена патогенетическая роль и продемонстрированы возможности метаболической коррекции нарушений промежуточного обмена углеводов головного мозга при формировании стойкого влечения к алкоголю.

1. У алкоголизированных животных установили снижение гедонических свойств глюкозы, что проявлялось уменьшением ее суточного потребления в условиях свободного выбора в 5,6 раза (с $1,5 \pm 0,6$ мл/0,1 кг/сут до $0,27 \pm 0,2$ мл/0,1 кг/сут) и уменьшение артериовенозной разницы для мозга по глюкозе в 3,5 раза (с $0,7 \pm 0,1$ ммоль/л до $0,2 \pm 0,1$ ммоль/л, $p < 0,001$), что сохранялось в условиях наргузочных проб. Уменьшалась утилизация глюкозы тканями головного мозга в 2 раза ($p < 0,001$) по сравнению с организмом в целом (в контроле – в 1,4 раза выше), активность ферментов ЛДГ, Г-6-ФДГ и СДГ. В условиях кратковременной углеводной нагрузки способность тканей алкоголизированного мозга поглощать глюкозу по показателям АВР снижается в большей степени (на $0,5 \pm 0,1$ ммоль/л), чем организмом в целом (на $0,1 \pm 0,1$ ммоль/л, $p < 0,001$).

2. При сформированном алкоголизме отмена алкоголя и коррекция унитиолом уже через 16 часов приводит к снижению содержания кетоновых тел в моче до до $0,5$ ммоль/л и демонстрирует формирование порочного круга - чем ниже падает уровень кетоновых тел в крови, тем больше крысы потребляют алкоголя ($2,4 \pm 0,6$ мл/0,1 кг/ч, $p < 0,05$) при предоставлении доступа к нему; чем больше потребление алкоголя, тем больше выраженность кетонурии. Сохранение высокого уровня кетоновых тел в последующие 6 часов сопровождалось снижением уровня добровольно потребленного алкоголя до $0,5 \pm 0,1$ мл/0,1 кг/ч ($p < 0,05$), что свидетельствует о существовании причинно-следственной обратно пропорциональной связи между уровнем кетоза и влечением к алкоголю.

3. Метаболическая коррекция унитиолом у алкоголизированных животных не снижает, а провоцирует еще большее влечение к этанолу: потребление алкоголя выросло до $5,1 \pm 0,3$ мл/0,1 кг/сут, по сравнению с крысами без коррекции (до $4,5 \pm 0,4$ мл/0,1 кг/сут), $p < 0,001$. При этом уровень гликемии оставалась стабильно низким ($4,0 \pm 0,3$ ммоль/л), $p > 0,05$. Длительное усиленное кормление раствором крахмала алкогользависимых крыс способствовало увеличению гедонических свойств глюкозы в 2,6 раза – суточное потребление 5% глюкозы возросло с $0,27 \pm 0,03$ мл/0,1 кг/сут до $0,7 \pm 0,1$ мл/0,1 кг/сут ($p < 0,001$) и достигало контрольных значений, сопровождалось нормализацией гликемии (с $3,0 \pm 0,1$ ммоль/л до $7,1 \pm 0,4$ ммоль/л, $p < 0,001$), уменьшало влечение к алкоголю (потребление снизилось с $6,4 \pm 0,1$ мл/0,1 кг/сут до $2,7 \pm 0,3$ мл/0,1 кг/сут, $p < 0,001$). При этом имеющая место у 63,3% крыс выраженная кетонурия после коррекции исчезала у 80% крыс.

4. Длительная патогенетическая коррекция гликемии путем введения крахмала *per os* приводит к увеличению в 3 раза ($p < 0,001$) артериовенозной разницы по глюкозе для головного мозга (с $0,2 \pm 0,1$ ммоль/л до $0,6 \pm 0,2$ ммоль/л), что носит более выраженный характер, чем для организма в целом (с $0,4 \pm 0,1$ ммоль/л до $0,5 \pm 0,1$ ммоль/л), а также к повышению активности ЛДГ и СДГ, свидетельствующему об обратимом характере нарушений углеводного и энергетического обмена в головном мозге при длительной алкоголизации.

5. Схема патогенеза формирования стойкого влечения к этанолу усовершенствована за счет выявленных особенностей перестройки углеводного и энергетического обмена в префронтальной коре, миндалевидном теле и прилежащем ядре головного мозга, зависимости мозга от кетоновых тел, как от энергетического субстрата, что приводит к возникновению биологической мотивации к потреблению этанола, как источника экзогенных кетонов.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

С учетом полученных в ходе данного исследования данных патогенетически обосновано введение в схему лечения хронического алкоголизма унитиола, в качестве донора сульфгидрильных групп, оказывающего протекторный эффект и снижающего выраженность процессов свободнорадикального окисления. Однако метаболическая коррекция унитиолом может провоцировать энергетическое голодание головного мозга и стабилизировать влечение к этанолу в условиях свободного выбора. Учитывая вышеизложенное, вытекает нецелесообразность подавлять кетоз при некоторых патологических состояниях, которые сопровождают алкогольную болезнь.

Введение в схему лечения хронической алкогольной зависимости длительной метаболической коррекции гликемии позволяет восстановить восстановить внутриклеточный метаболизм, нейромедиаторный обмен и уменьшить степень влечения к этанолу в долгосрочном периоде. Эти факты позволяют обосновать взаимодополняющие эффекты двух патогенетически обусловленных видов влияния на состояние внутриклеточного метаболизма (унитиолом и усиленным углеводным питанием) в составе сочетанной метаболической коррекции алкоголизма.

При возможной терапии хронического алкоголизма унитиолом рекомендовано дополнение схемы лечения или усиленным углеводным питанием, или проведенное его на фоне внутривенного введения растворов глюкозы.

ПЕРЕЧЕНЬ СОКРАЩЕНИЙ

- IL – интерлейкин
- NMDA-рецептор – N-methyl-D-aspartat-receptor (рецептор к N-метил-D-аспартату)
- ABP – артериовенозная разница
- АлДГ – алкогольдегидрогеназа
- АльдГ – альдегиддегидрогеназа
- АТФ – аденозинтрифосфорная кислота
- Ацетил-КоА – ацетил-коэнзим А
- Г-6-ФДГ – глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа
- ГАМК – гамма-аминомасляная кислота
- ГЭБ – гемато-энцефалический барьер
- ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота
- ЛДГ – лактатдегидрогеназа
- НАД – никотин-амид-аденин-динуклеотид
- НАДН – никотин-амид-аденин-динуклеотид восстановленный
- НАДФ – никотин-амид-аденин-динуклеотид фосфат
- ПЭТ – позитронная эмиссионная томография
- P-450 – цитохром P450-зависимая монооксигеназа
- РНК – рибонуклеиновая кислота
- СДГ – сукцинатдегидрогеназа
- ЦНС – центральная нервная система
- ЦТК – цикл трикарбоновых кислот
- NaCl – натрия хлорид

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Акалаев Р.Н. Острые отравления алкоголем. Эпидемиология, диагностика, лечение и анализ нерешенных проблем [Текст] / Р.Н. Акалаев, А.А. Стопницкий, Х.Ш. Хожиев // Вестник экстренной медицины. – 2017. – №X (1). – С. 104-111.
2. Альдегиды [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://ru.wikipedia.org/wiki>
3. Анохина И. П. Методические рекомендации по изучению лекарственных средств для лечения алкоголизма / И. П. Анохина, Л. Г. Колик // Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств / ФГБУ «НЦЭСМП» Минздравсоцразвития России. – Москва : Гриф и К, 2012. – С. 310-333.
4. Багдасарова Э.С. Роль кетоза при алкогольной зависимости и эффективность препаратов при устранении алкоголизма / Э.С. Багдасарова, В.Б. Расулова // International Academy Journal Web of Scholar. – 2019. - №1. – С. 31-35.
5. Біохімічні показники в нормі і при патології [Текст] / О.Я. Скляр, Т.І. Бондарчук, Ю.В. Мандрик, М.Є. Червінська; ред. проф. Скляр О.Я. – К.: Медицина, 2007. – 320 с.
6. Биохимия. Учебник для вузов [Текст] / Под ред. Е.С. Северина. – М., ГЭОТАР Медиа, 2003. – 779 с.
7. Биохимия. Синтез кетонных тел. [Электронный ресурс]. – Режим доступа: www.biochemistry.terra-medica.ru/lekcii-po-biohimii
8. Бортникова А.К. Влияние уровня гликемии на потребление этанола и глюкозы алкогользависимыми крысами [Текст] / А.К. Бортникова, Т.И. Панова, В.Н. Казаков // Университетская клиника. – 2013. – Т. 9, № 2. – С. 169-173.
9. Бортникова А.К. Влечение к этанолу у алкоголизированных крыс и уровень гликемии, выраженность кетоза [Текст] / А.К. Бортникова, Т.И. Панова // Лабораторная диагностика. Восточная Европа. – 2014. – № 1 (9). – С. 52-61.
10. Бортникова А.К. Снижение способности мозга алкоголизированных крыс утилизировать глюкозу [Текст] / А.К. Бортникова, В.Н. Казаков, Т.И. Панова

// Архив клинической и экспериментальной медицины. – 2013. – Т. 22, № 1. – С. 161-164.

11. Возрастзависимая модификация гистонов. [Электронный ресурс]. – Режим доступа: www.moscowuniversityclub.ru

12. Гидроксильная группа. [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://ru.wikipedia.org/wiki/>

13. Гланц С. Медико-биологическая статистика [Текст] / С. Гланц – Москва: Практика, 1999. – 459с.

14. Дробленков А.В. Изменения нейроглиальных комплексов мезокортиколимбической дофаминергической системы мозга при длительной алкоголизации и после её отмены у крыс [Текст] / А.В. Дробленков, А.А. Лебедев, П.Д. Шабанов // Наркология. – 2008. – № 8. – С. 55-58.

15. Дробленков А.В. Нейроно-глиальное взаимодействие в дофаминергических структурах мозга лиц, умерших от алкогольной интоксикации [Текст] / А.В. Дробленков, П.Д. Шабанов // Наркология. – 2011. – № 3. – С. 43-50.

16. Європейська конвенція про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних та інших наукових цілей [Текст] / Страсбург, 18 березня 1986 року: Збірка договорів Ради Європи: Українська версія // Є.М. Вишневський (пер. та ред.). – К.: Парламентське видавництво, 2000. – 654 с.

17. Зупанец И.А. Фармацевтическая опека: клинико-фармацевтические аспекты применения алкоголя в медицине [Текст] / И.А. Зупанец, Н.В. Бездетко, Л.В. Деримедведь // Провизор. – 2003. – Вып. 4. – С. 2-4.

18. Кишкун, А. А. Клиническая лабораторная диагностика : учебное пособие / Кишкун А. А. - Москва : ГЭОТАР-Медиа, 2015. - 976 с.

19. Квартыч Е.И. Метаболизм этанола в печени и предрасположенность к алкоголю [Электронный ресурс] / Тихонова И.Н., Помазанова Е.В. // Медицина. Социология. Философия. Прикладные исследования. 2020. №6. – Режим доступа: <https://cyberleninka.ru/article/n/metabolizm-etanola-v-pecheni-i-predraspolozhennost-k-alkogolyu>

20. Клінічна біохімія [Текст] / За ред. проф. О.Я. Склярова // К., Медицина, 2006. – 431 с.
21. Клиническая нейрореаниматология. [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://neuroreanimatologia.ru/3/>
22. Клиническая лабораторная аналитика - под редакцией Меньшикова В. В. Том III — Частные аналитические технологии в клинической лаборатории. - Москва, Лабпресс. – 2000. - 328 с.
23. Кнышова Л. П. Критерии достоверности воспроизведения экспериментальной модели хронической алкогольной интоксикации [Текст] / Л. П. Кнышова, С. В. Поройский, А. Т. Яковлев, Е. И. Морковин, А. С. Тарасов // Волгоградский научно-медицинский журнал. – 2016. – № 4. – С. 48-51.
24. Колмакова Т.С. Современное представление об эпигенетических механизмах формирования наркозависимости и психических расстройств эмоциональной сферы [Текст] / Т.С. Колмакова, Н.А. Григорян // Фундаментальные исследования. – 2012. – № 10 (часть 2). – С. 380-385.
25. Лабораторные животные [Текст] / И.П. Западнюк, В.И. Западнюк, Е.А. Захария, Б.В. Западнюк. – К: Вища школа, 1983. – 386 с.
26. Лелевич В.В. Метаболические эффекты хронической алкогольной интоксикации [Текст] / Лелевич В.В., Леднева И.О., Лелевич С.В. // Журнал ГрГМУ. 2017. №3. С. 310-314.
27. Машковский М. Д. Лекарственные средства. 15-е изд. [Текст] / М.Д. Машковский // М.: ООО «Издательство Новая Волна», 2005. – 1206 с.
28. Методы лечения алкоголизма. [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://lecheniealcogolizma.ru/>.
29. Мецлер Д. Биохимия. Т.2. [Текст] / Д. Мецлер. – М.: Мир, 1980. – 609 с.
30. Механизмы регуляции транскрипции. [Электронный ресурс]. – Режим доступа: www.i-vao.com
31. Механизмы регуляции транскрипции. [Электронный ресурс]. – Режим доступа: www.medbiol.ru

32. Модуляция интерлейкином-1b потребления этанола у крыс с разным уровнем его предпочтени [Текст] / О.Е. Зубарева, А.А. Лебедев, А.С. Симбирцев [и др.] // Наркология. – 2007. – № 11. – С. 14-16.
33. Морыганова, Ю. А. Химический анализ в энергетике : Книга 1. Фотометрия. Книга 2. Титриметрия и гравиметрия / В. Л. Меньшикова, Ю. А. Морыганова // Москва : МЭИ, 2016. - Текст : электронный. Режим доступа: <https://www.studentlibrary.ru/book/ISBN9785383010334.html>
34. Ноздрачев А.Д. Анатомия крысы [Текст] / А.Д. Ноздрачев, Е.Л. Поляков // С.-Пб.: Лань, 2001. – 464 с.
35. Наркологія [Текст] / О.К. Напрєєнко, Л.В. Животовська, Н.Ю. Петрина, Л.В. Рахман; ред. проф. О.К. Напрєєнко / Київ: Здоров'я, 2011. – 208 с.
36. Ноотропы. [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://ru.wikipedia.org/wiki/>
37. Общеклинические исследования: моча, кал, ликвор, мокрота: Учебно-практическое руководство, 3-е издание, исправленное и дополненное [Текст] / Миронова И.И., Романова ЛА., Долгов В.В./ Тверь: Триада, 2012. – 420 с.
38. Основы компьютерной биостатистики: анализ информации в биологии, медицине и фармации статистическим пакетом MedStat [Текст] / Ю.Е. Лях, В.Г. Гурьянов, В.Н. Хоменко, О.А. Панченко. – Донецк: Издатель Папакица Е.К., 2006. – 214 с.
39. Панова Т.И. Алкогольный кетоз как причина зависимости. Экспериментальное исследование [Текст] / Т.И. Панова // Архив клинической и экспериментальной медицины. – 2013. – Т. 22, № 2. – С. 155-160.
40. Панова Т.І. Нейрохімічні механізми толерантності та абстинентного синдрому [Текст] / Т.І. Панова // Нейронауки: теоретичні та клінічні аспекти. – 2013. – Т. 9, № 1-2. – С. 54-57.
41. Панова Т.И. Молекулярные механизмы развития алкогольной зависимости [Текст] / Т.И. Панова // Нейронауки: теоретичні та клінічні аспекти. – 2012. – Т. 8, № 2. – С. 167-174.

42. Панова Т.И. Альтерирующее влияние этанола на мозг [Текст] / Т.И. Панова // Университетская клиника. – 2012. – Т. 8, № 2. – С. 192-195.
43. Панова Т.И. Генные мутации как причина формирования зависимости [Текст] / Т.И. Панова // Университетская клиника 2013. – Т. 9, № 2. – С. 244-247.
44. Петри А. Наглядная статистика в медицине [Текст] / А. Петри, К. Сэбин; Пер. с англ. В.П. Леонова. – М.: ГЭОТАР-МЕДИА, 2009. – 166 с.
45. Прохорова М.И. Нейрохимия [Текст] / М.И. Прохорова // Л.: Изд-во Ленинградского университета, 1979. – 271 с.
46. Разводовский, Ю. Е. Прогнозирование уровня фатальных алкогольных отравлений в России [Текст] / Ю. Е. Разводовский, В. Ю. Смирнов, П. Б. Зотов // Российский медико-биологический вестник имени академика И.П. Павлова. – 2016. – № 4. – С. 67-76.
47. Рецепторы инсулина. [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://medinteres.ru/endokrinologiya/retseptoryi-insulina.html>
48. Руководство по лабораторным животным и альтернативным моделям в биомедицинских технологиях. Под ред. Каркищенко Н.Н, Грачева С.В. - 2010. 344 с.
49. Самойлов А. Н. Характеристика токсического действия при острых отравлениях метанолом и этанолом [Электронный ресурс] / Самойлов А. Н. Бариева А.М. // Офтальмол. Ведомости. 2020. №1. – Режим доступа: <https://cyberleninka.ru/article/n/harakteristika-toksicheskogo-deystviya-pri-ostryh-otravleniyah-metanolom-i-etanolom> (дата обращения: 08.04.2021).
50. Сергиенко В.И. Математическая статистика в клинических исследованиях [Текст] / В.И. Сергиенко, И.Б. Бондарева. – М.: ГЭОТАР-МЕД, 2001. – 256 с.
51. Сиволап Ю.П. К вопросу о рациональном лечении в наркологии [Текст] / Ю.П. Сиволап // Наркология. – 2011. – № 12. – С. 79-81.
52. Сквиря И. М. Противорецидивная фармакотерапия алкогольной зависимости (обзор литературы) // Проблемы здоровья и экологии. - 2014. №2

(40). Режим доступа: <https://cyberleninka.ru/article/n/protivoretsidivnaya-farmakoterapiya-alkogolnoy-zavisimosti-obzor-literatury>

53. Способ моделирования гиперактивного мочевого пузыря [Текст] / А.В. Гудков, Д.В. Титов, А.В. Царева, М.Б. Плотников, Т.Г. Боровская. – Патент РФ № 2496148. – 20.10.2013. Подача заявки 12.05.2012.

54. Титов В. Н. Кетоновые тела - оптимальная форма циркуляции в крови жирных кислот для переноса в локальном пуле спинномозговой жидкости за гематоэнцефалическим барьером [Текст] / Титов В. Н. // Клиническая лабораторная диагностика. – 2017. – №7. – С. 388-389

55. Фаращук Н.Ф. Соотношение структурных фракций воды в крови и головном мозге крыс как показатель повреждающего действия этанола [Текст] / Н.Ф. Фаращук, Л.М. Смирнова // Наркология. – 2008. – № 3. – С. 41-44.

56. Федулов А.П. Изучение распространённости употребления алкоголя и нарушений когнитивной деятельности у лиц молодого возраста и больных алкоголизмом [Текст] / А.П. Федулов // Автореферат дисс. к. биол. н. 14.00.45 – М. – 2009. – 158 с.

57. Халафян А.А. Статистический анализ данных. STATISTICA 6.0. [Текст] / А.А. Халафян. – Краснодар: КубГУ, 2005. – 307с.

58. Шабанов П.Д. Влияние внутриутробного действия этанола на созревание оксидантных и антиоксидантных систем в развивающемся мозге крыс [Текст] / П.Д. Шабанов, С.О. Бурмистров // Наркология. – 2010. – № 4. – С. 25-33.

59. Энергетические субстраты при голодании. [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://www.porumed.net/study-144-80.html>

60. Эпигенетика. [Электронный ресурс]. – Режим доступа: www.porumed.net

61. Эпигенетические механизмы регуляции работы генов. [Электронный ресурс]. – Режим доступа: www.studopedia.ru

62. Activation of glycolysis and apoptosis in glycogen storage disease type Ia [Text] / B. Sun, S. Li, L. Yang [et. al.] // Mol. Genet. Metab. – 2009. – Vol. 97, No. 4. – P. 267-271.

63. Acute alcohol intoxication decreases glucose metabolism but increases acetate uptake in the human brain [Text] / N.D. Volkow, S.W. Kim, G.J. Wang [et. al.] // *Neuroimage*. – 2013. – Vol. 64, No. 1. – P. 277-283.
64. Acute effects of oral and intravenous ethanol on rat hepatic enzyme activities [Text] / F.B. Stifel, H.L. Greene, E.G. Lufkin [et. al.] // *Biochim. Biophys. Acta*. – 1976. – Vol. 428, No. 3. – P. 633-638.
65. Alcoholic ketoacidosis and reversible neurological complications due to hypophosphataemia [Text] / M.T. Fernández López, M.D. García Bargo, M.T. Rivero Luis [et. al.] // *Nutr. Hosp.* 2012. – Vol. 27, No. 3. – P. 936-939.
66. Alexander-Kaufman K. Transketolase: observations in alcohol-related brain damage research [Text] / K. Alexander-Kaufman, C. Harper // *Int. J. Biochem. Cell Biol.* – 2009. – Vol. 41, No. 4. – P. 717-720.
67. Allelic variants of ADH, ALDH and the five factor model of personality in alcohol dependence syndrome [Text] / S.K. Salujha, S. Chaudhury, P.K. Menon [et. al.] // *Ind. Psychiatry J.* – 2014. – Vol. 23, No. 1. – P. 44-51.
68. Alvarez I. Effects of chronic alcoholism on the amygdaloid complex. A study in human and rats [Text] / I. Alvarez, L.M. Gonzalo, J. Llor // *Histol Histopathol.* – 1989. – Vol.4, No. 2. – P.183-192.
69. Association between ADH1C and ALDH2 polymorphisms and alcoholism in a Turkish sample [Text] / Y. Ayhan, S.C. Gürel, O. Karaca [et. al.] // *Nord J. Psychiatry.* – 2014. – No. 5. – P. 1-7.
70. Binge alcohol promotes hypoxic liver injury through a CYP2E1-HIF-1 α -dependent apoptosis pathway in mice and humans [Text] / J.W. Yun, M.J. Son, M.A. Abdelmegeed [et. al.] // *Free Radic. Biol. Med.* – 2014. – No. 77. – P. 183-194.
71. Bird A. Perceptions of epigenetics [Text] / A. Bird // *Nature*. – 2007. – Vol. 447. – P. 396-398.
72. Bortnikova A.K. Peculiarities of Utilization of Glucose by Brain Tissues of Alcohol-Dependent Rats [Text] / A.K.Bortnikova, T.I. Panova. // *Neurophysiology.* – 2014. – V. 46, Issue 3. – P. 206-211.

73. Brain glucose sensing, glucokinase and neural control of metabolism and islet function [Text] / E.O. Ogunnowo-Bada, N. Heeley, L. Brochard [et. al.] // *Diabetes Obes Metab.* – 2014. – Vol. 16, Suppl 1. – P. 26-32.

74. Brain insulin signaling and Alzheimer's disease: current evidence and future directions [Text] / H.B. Schiöth, S. Craft, S.J. Brooks [et. al.] // *Mol Neurobiol.* – 2012. – Vol. 46, No. 1. – P. 4-10.

75. Brain oxygen utilization is unchanged by hypoglycemia in normal humans: lactate, alanine, and leucine uptake are not sufficient to offset energy deficit [Text] / J.M. Lubow, I.G. Pinon, A. Avogaro [et. al.] // *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* – 2006. – Vol. 290, No. 1. – P. E149-E153.

76. Buck-Koehntop B.A. On how mammalian transcription factors recognize methylated DNA [Text] / B.A. Buck-Koehntop, P.A. Defossez // *Epigenetics.* – 2013. – Vol. 8, No. 2. – P. 131-137.

77. Carnitine: function, metabolism and value in hepatic failure during chronic alcohol intoxication [Text] / A. Kepka, S.D. Szajda, N. Waszkiewicz [et. al.] // *Postepy Hig. Med. Dosw.* – 2011. – No. 65. – P. 645-653.

78. Cerebral glucose and oxygen metabolism in patients with fulminant hepatic failure [Text] / G.I. Strauss, K. Moller, F.S. Larsen [et. al.] // *Liver. Transpl.* – 2003. – Vol. 9, No. 12. – P. 1244-1252.

79. Changed accumbal responsiveness to alcohol in rats pre-treated with nicotine or the cannabinoid receptor agonist WIN 55,212-2 [Text] / J.A. Lopez-Moreno, M. Scherma, F. Rodríguez de Fonseca [et. al.] // *Neurosci Lett.* – 2008. – Vol. 433, No. 1. – P. 1-5.

80. Characteristics of patients with ketosis-prone diabetes (KPD) presenting with acute pancreatitis: implications for the natural history and etiology of a KPD subgroup [Text] / R. Fernandez, R. Misra, R. Nalini [et. al.] // *Endocr. Pract.* – 2013 Vol. 19, No. 2. – P. 243-251.

81. Chen M.H. Alcoholic ketoacidosis coincides with acute Marchiafava-Bignami disease [Text] / M.H. Chen, C.A. Cheng // *Am. J. Emerg. Med.* – 2012. – Vol. 30, No. 9. – P. e7-8.

82. Chronic ethanol consumption increases dopamine uptake in the nucleus accumbens of high alcohol drinking rats [Text] / M.R. Carroll, Z.A. Rodd, J.M. Murphy [et. al.] // Alcohol. – 2006. – Vol. 40, No. 2. – P. 103-109.

83. Cocaine dysregulates opioid gating of GABA neurotransmission in the ventral pallidum [Text] / Y.M. Kupchik, M.D. Scofield, K.C. Rice [et. al.] // J. Neurosci. – 2014. – Vol. 34, No. 3. – P. 1057-1066.

84. Concomitant effects of nitric oxide and carotid chemoreceptor stimulation on brain glucose in normoglycemic and hyperglycemic rats [Text] / H.R. Tejada-Chavez, S.A. Montero, M. Lemus [et. al.] // Arch. Med. Res. – 2010. – Vol. 41, No. 7. – P. 487-496.

85. Creed M.C. VTA GABA neurons modulate specific learning behaviors through the control of dopamine and cholinergic systems [Electronic resource] / M.C. Creed, N.R. Ntamati, K.R. Tan // Front Behav Neurosci. – 2014. – 8:8. Mode of access: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>

86. Dasmahapatra A.K. DNA methyltransferase expressions in Japanese rice fish (*Oryzias latipes*) embryogenesis is developmentally regulated and modulated by ethanol and 5-azacytidine [Text] / A.K. Dasmahapatra, I.A. Khan // Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol. – 2015. – No. 176-177. – P. 1-9.

87. Deitrich R.A. Acetaldehyde: déjà vu du jour. Review [Text] / R.A. Deitrich // J. Stud. Alcohol. – 2004. – Vol. 65, No. 5. – P. 557-572.

88. Determinants of taste preference and acceptability: quality versus hedonics [Text] / G.C. Loney, G.D. Blonde, L.A. Eckel [et. al.] // J. Neurosci. – 2012. – Vol. 32, No. 29. – P. 10086-10092.

89. Determination of ketone bodies in blood by headspace gas chromatography-mass spectrometry [Text] / K.M. Holm, K. Linnet, B.S. Rasmussen [et. al.] // J. Anal. Toxicol. – 2010. Vol. 34, No. 9. – P. 549-554.

90. Different mechanisms for histone acetylation by ethanol and its metabolite acetate in rat primary hepatocytes [Text] / S.D. Shukla, R. Restrepo, P. Fish [et. al.] // J Pharmacol Exp Ther. – 2015. – Vol. 354, No. 1. – P. 18-23.

91. Differential induction of ethanol-metabolizing CYP2E1 and nicotine-metabolizing CYP2B1/2 in rat liver by chronic nicotine treatment and voluntary ethanol intake [Text] / J. Yue, J. Khokhar, S. Miksys [et. al.] // *Eur. J. Pharmacol.* – 2009. – Vol. 609, No. 1-3. – P. 88-95.
92. Disease-associated epigenetic changes in monozygotic twins discordant for schizophrenia and bipolar disorder [Text] / E.L. Dempster, R. Pidsley, L.C. Schalkwyk [et. al.] // *Human Molecular Genetics.* – 2011. – Vol. 20, No. 24. – P. 4786-4796.
93. Distel C. Alcohol induced diabetic ketoacidosis exacerbated by an acute respiratory infection with *Klebsiella pneumonia* [Text] / C. Distel, S. Jacobson, P.M. Tille // *Clin. Lab. Sci.* – 2013. – Vol. 26, No. 2. – P. 68-71.
94. Disulfiram treatment of alcoholism [Text] / R. Fuller, L. Branchey, D. Brightwell [et. al.] // *JAMA.* – 1986. – Vol. 256, No. 12. – P. 1449-1455.
95. Drinking History Associations with Regional White Matter Volumes in Alcoholic Men and Women [Text] / S.M. Ruiz, M. Oscar-Berman, K.S. Sawyer [et. al.] // *Alcohol Clin. Exp. Res.* – 2012.
96. Droblenkov A.V. Activation of programmed cell death and degenerative changes of neurons of mesocorticolimbic dopaminergic system as a possible cause of inherited alcohol addiction [Text] / A.V. Droblenkov, N.R. Karelina // *Morfologiya.* – 2012. – Vol. 141, No. 1. – P. 16-22.
97. Dwyer J.B. Ketoacidosis and trace amounts of isopropanol in a chronic alcoholic patient [Text] / J.B. Dwyer, K. Tamama // *Clin. Chim. Acta.* – 2013. No. 415. – P. 245-249.
98. Early maternal alcohol consumption alters hippocampal DNA methylation, gene expression and volume in a mouse model [] / H. Marjonen, A. Sierra, A. Nyman [et. al.] // *PLoS One.* – 2015. – Vol. 10, No. 5. – e 0124931.
99. Edenberg H.J. Genetics of alcoholism [Text] / H.J. Edenberg, T. Foroud // *Handb. Clin. Neurol.* – 2014. – No. 125. – P. 561-571.
100. Effect of intermittent exposure to ethanol and MDMA during adolescence on learning and memory in adult mice [Text] / A. Vidal-Infer, M.A. Aguilar, J. Miñarro [et. al.] // *Behav. Brain Funct.* – 2012. – Vol. 8, No. 1. – P. 32.

101. Effects of acute combined serotonin and dopamine depletion on cue-induced drinking intention/desire and cognitive function in patients with alcohol dependence [Text] / H.Q. Sun, Y. Liu, P. Li [et. al.] // *Drug Alcohol Depend.* – 2012. – Vol. 124, No. 3. – P. 200-206.

102. Effects of acute ethanol exposure on class I HDACs family enzymes in wild-type and BDNF(+/-) mice [Text] / F.F. Caputi, M. Palmisano, C. D'Addario [et. al.] // *Drug Alcohol Depend.* – 2015. – No. 155. – P. 68-75.

103. Effects of dopamine antagonists on methamphetamine-induced dopamine release in high and low alcohol preference rats [Text] / M. Nishiguchi, H. Kinoshita, S. Kasuda [et. al.] // *Toxicol. Mech. Methods.* – 2010. – Vol. 20, No. 3. – P. 127-132.

104. Effects of ethanol during adolescence on the number of neurons and glia in the medial prefrontal cortex and basolateral amygdala of adult male and female rats [Text] / W.A. Koss, R.N. Sadowski, L.K. Sherrill [et. al.] // *Brain Res.* – 2012. – No. 1466. – P. 24-32.

105. Effects of exposure to moderate levels of ethanol during prenatal brain development on dendritic length, branching, and spine density in the nucleus accumbens and dorsal striatum of adult rats [Text] / J.P. Rice, L.E. Suggs, A.V. Lusk [et. al.] // *Alcohol.* – 2012. – Vol. 46, No. 6. – P. 577-584.

106. Elliott S. The post-mortem relationship between beta-hydroxybutyrate (BHB), acetone and ethanol in ketoacidosis [Text] / S. Elliott, C. Smith, D. Cassidy // *Forensic. Sci. Int.* – 2010. – Vol. 198, No. 1-3. – P. 53-57.

107. Elucidating the biological basis for the reinforcing actions of alcohol in the mesolimbic dopamine system: the role of active metabolites of alcohol [Text] / G.A.Jr. Deehan, S.R. Hauser, J.A. Wilden [et. al.] // *Front. Behav. Neurosci.* – 2013. – No. 7. – P. 104.

108. Epigenetics [Text] / C.D. Allis, T. Jenuwein, D. Reinberg [et. al.] // Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1-st edition. – 2007. – 520 p.

109. Epigenetic aberrations in leukocytes of patients with schizophrenia: association of global DNA methylation with antipsychotic drug treatment and disease

onset [Text] / P.A. Melas, M. Rogdaki, U. Osby [et. al.] // *FASEB J.* 2012. – Vol. 26, No. 6. – P. 2712-2718.

110. Epigenetic Regulation in Psychiatric Disorders [Text] / N. Tsankova, W. Renthal, A. Kumar [et. al.] // *Nature Reviews Neuroscience.* – 2007. – Vol. 8. – P. 355-367.

111. Ethanol-induced alterations in fatty acid-related lipids in serum and tissues in mice [Text] / Z. Zhao, M. Yu, D. Crabb [et. al.] // *Alcohol. Clin. Exp. Res.* – 2011. – Vol. 35, No. 2. – P. 229-234.

112. Ethanol influences on bax associations with mitochondrial membrane proteins in neonatal rat cerebellum [Text] / M.B. Heaton, K. Siler-Marsiglio, M. Paiva [et. al.] // *Dev. Neurobiol.* – 2013. – Vol. 73, No. 2. – P. 127-141.

113. Ethanol reduces expression of apoptotic proteins after hypoxia/reoxygenation in a brain slice model [Text] / Y. Yuan, C. Peng, K. Li. [et. al.] // *Neurol. Res.* – 2012. – Vol. 34, No. 4. – P. 373-378.

114. Ethanol, sugar, acid and coma [Text] / H. Meier, S. Gschwend, S. Raimondi [et. al.] // *Praxis (Bern 1994).* – 2011. – Vol. 100, No. 13. – P. 797-799.

115. Everett J.C. Effects of third trimester-equivalent ethanol exposure on Cl⁽⁻⁾ co-transporter expression, network activity, and GABAergic transmission in the CA3 hippocampal region of neonatal rats [Text] / J.C. Everett, Y. Licón-Muñoz, C.F. Valenzuela // *Alcohol.* – 2012. – Vol. 46, No. 6. – P. 595-601.

116. Expression of aquaporin-4 augments cytotoxic brain edema after traumatic brain injury during acute ethanol exposure [Text] / R. Katada, Y. Nishitani, O. Honmou [et. al.] // *Am. J. Pathol.* – 2012. – Vol. 180, No. 1. – P. 17-23.

117. Fenofibrate – a lipid-lowering drug – reduces voluntary alcohol drinking in rats [Text] / E. Karahanian, M.E. Quintanilla, K. Fernandez [et. al.] // *Alcohol.* – 2014. – Vol. 48, No. 7. – P. 665-670.

118. Formation of acetaldehyde-derived DNA adducts due to alcohol exposure. Review [Text] / H.S. Yu, T. Oyama, T. Isse [et. al.] // *Chem. Biol. Interact.* – 2010. – Vol. 188, No. 3. – P. 367-375.

119. Forthofer R.N. Biostatistics: a guide to design, analysis, and discovery [Text] / R.N. Forthofer, E. S. Lee, M. Hernandez. – Elsevier Inc, 2007. – 502 p.
120. Gabapentin treatment for alcohol dependence: a randomized clinical trial. [Text] / B.J. Mason, S. Quello, V. Goodell [et. al.] // JAMA Intern Med. –2014. – Vol. 174, No. 1. – P. 70-77.
121. Gamma-aminobutyric Acid system genes-no evidence for a role in alcohol use and abuse in a community-based sample [Text] / D.E. Irons, W.G. Iacono, W.S. Oetting [et. al.] // Alcohol Clin. Exp. Res. – 2014. – Vol. 38, No. 4. – P. 938-947.
122. George O. Allostasis and addiction: role of the dopamine and corticotropin-releasing factor systems [Text] / O. George, M. Le Moal, G.F. Koob // Physiol Behav. – 2012. – Vol. 106, No. 1. – P. 58-64.
123. Girdler S.S. Neurosteroids in the context of stress: implications for depressive disorders [Text] / S.S. Girdler, R. Klatzkin // Pharmacol Ther. – 2007. – Vol. 116, No. 1. – P. 125-139.
124. Glucose prediction by analysis of exhaled metabolites – a systematic review [Text] / J.H. Leopold, R.T. van Hooijdonk, P.J. Sterk [et. al.] // BMC Anesthesiol. – 2014. – No. 14. – P. 46.
125. González A. Ethanol stimulates ROS generation by mitochondria through Ca²⁺ mobilization and increases GFAP content in rat hippocampal astrocytes [Text] / A. González, J.A. Pariente, G.M. Salido // Brain Res. – 2007. – No. 1178. – P. 28-37.
126. Gray S.M. Insulin regulates brain function, but how does it get there? [Text] / S.M. Gray, R.I. Meijer, E.J. Barrett // Diabetes. – 2014. – Vol. 63, No. 12. – P. 3992-3997.
127. Harper C. The neuropathology of alcohol-specific brain damage, or does alcohol damage the brain? [Text] / C. Harper // J Neuropathol Exp Neurol. – 1998. – Vol.57, No. 2. – P. 101-110.
128. Hassan H.M. Determination of beta-hydroxybutyrate in blood and urine using gas chromatography-mass spectrometry [Text] / H.M. Hassan, G.A. Cooper // J. Anal. Toxicol. – 2009. – Vol. 33, No. 8. – P. 502-507.

129. Helto K. Alcoholic ketoacidosis and lactic acidosis [Text] / K. Helto // Ugeskr. Laeger. – 2009. – Vol. 171, No. 5. – P. 318-319.
130. Heninger M. Postmortem vitreous beta-hydroxybutyrate: interpretation in a forensic setting [Text] / M. Heninger // J. Forensic Sci. – 2012. – Vol. 57, No. 5. – P. 1234-1240.
131. Histone Deacetylase Gene Expression Following Binge Alcohol Consumption in Rats and Humans [Text] / J.A. López-Moreno, M. Marcos, J. Calleja-Conde [et. al.] // Alcohol Clin Exp Res. – 2015. – Vol. 39, No. 10. – P. 1939-1950.
132. Hypothalamic-pituitary-adrenal axis modulation of GABAergic neuroactive steroids influences ethanol sensitivity and drinking behavior [Text] / A.L. Morrow, P. Porcu, K.N. Boyd, K.A. Grant // Dialogues Clin Neurosci. – 2006. – Vol. 8, No. 4. – P. 463-477.
133. Increased DNA methylation in the livers of patients with alcoholic hepatitis [Text] / H. Shen, B.A. French, B.C. Tillman [et. al.] // Exp Mol Pathol. – 2015. Vol. 99, No. 2. – P. 326-329.
134. Intermittent ethanol exposure increases long-lasting behavioral and neurochemical effects of MDMA in adolescent mice [Text] / M. Rodríguez-Arias, C. Maldonado, A. Vidal-Infer [et. al.] // Psychopharmacology (Berl). – 2011. Vol. 218, No. 2. – P. 429-442.
135. Insulin action in brain regulates systemic metabolism and brain function [Text] / A. Kleinridders, H.A. Ferris, W. Cai, C.R. Kahn // Diabetes. – 2014. – Vol. 63, No. 7. – P. 2232-2243.
136. Insulin in the brain: its pathophysiological implications for States related with central insulin resistance, type 2 diabetes and Alzheimer's disease [Text] / E. Blázquez, E. Velázquez, V. Hurtado-Carneiro [et.al.] // Front Endocrinol (Lausanne). – 2014. – No. 5. – P. 161.
137. Investigation of markers to indicate and distinguish death due to alcoholic ketoacidosis, diabetic ketoacidosis and hyperosmolar hyperglycemic state using post-mortem samples [Text] / J. Hockenull, W. Dhillon, R. Andrews [et. al.] // Forensic. Sci. Int. – 2012. – Vol. 214, No. 1-3. – P. 142-147.

138. Involvement of Dopamine D2 Receptors in Addictive-Like Behaviour for Acetaldehyde [Electronic resource] / A. Brancato, F. Plescia, R. A. Marino [et. al.] // PLoS One. – 2014. – Vol. 9, No. 6. – e99454. Mode of access: <http://www.plosone.org/scihub.org/article/info>

139. Iron complexation to histone deacetylase inhibitors SAHA and LAQ824 in PEGylated liposomes can considerably improve pharmacokinetics in rats [Text] / Y. Wang, S. Tu, D. Steffen, M. Xiong // J Pharm Pharm Sci. – 2014. – Vol. 17, No. 4. – P. 583-602.

140. Genetics of alcoholism [Text] / P.A. Iyer-Eimerbrink, J.I.Jr. Nurnberger // Curr. Psychiatry Rep. – 2014. – Vol. 16, No. 12. – P. 518.

141. Jain H. Alcohol induced ketoacidosis, severe hypoglycemia and irreversible encephalopathy [Text] / H. Jain, S. Beriwal, S. Singh // Med. Sci. Monit. – 2002. – Vol. 8, No. 11. – P. CS77-79.

142. Jorgensen C.H. The efficacy of disulfiram for the treatment of alcohol use disorder [Text] / C.H. Jorgensen, B. Pedersen, H. Tønnesen // Alcohol Clin Exp Res. – 2011. – Vol. 35, No. 10. – P. 1749-1758.

143. Kahn C.R. Insulin action in the brain and the pathogenesis of Alzheimer's disease [Text] / C.R. Kahn, R. Suzuki / In: Diabetes, insulin and Alzheimer's disease. Ed. S. Craft. – Hardcover: Springer, 2010, XIV. – 218 p.

144. Kalivas P.W. The Neural Basis of Addiction: A Pathology of Motivation and Choice [Text] / P.W. Kalivas, N.D. Volkow // Am. J. Psychiatry. – 2005. – Vol. 162, No. 8. – P. 1403-1413.

145. Kamal H. Alcohol Use Disorder, Neurodegeneration, Alzheimer's and Parkinson's Disease: Interplay Between Oxidative Stress, Neuroimmune Response and Excitotoxicity / Kamal H., Tan G.C., Ibrahim S.F., Shaikh M.F., Mohamed I.N., Mohamed R.P., Hamid A.A., Ugusman A., Kumar J. // Frontiers in Cellular Neuroscience. 2020. P. 282.

146. Karina P. A. Alcohol and the Brain: Neuronal Molecular Targets, Synapses, and Circuits [Text] / Karina P. A., Armando G. S., David M.L. // Neuron. – 2017. – Vol. 96, No.6. – P.1205-1458.

147. Khurdayan V. Chronicles in drug discovery [Text] / V. Khurdayan, J. Bozzo, L. Sorbera // *Drug News Perspect.* 2005. – Vol. 18, No. 5. – P. 332-336.
148. «Killing Two Birds with One Stone»: Alcohol Use Reduction Interventions with Potential Efficacy in Enhancing Self-Control [Electronic resource] / R.F. Leeman, D. Bogart, L.M. Fucito [et. al.] // *Curr. Addict Rep.* – 2014. – Vol. 1, No. 1. – P. 41-52. Mode of access: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24914414>
149. Kim S.J. Alcoholism and diabetes mellitus [Text] / S.J. Kim, D.J. Kim // *Diabetes. Metab. J.* – 2012. – Vol. 36, No. 2. – P. 108-115.
150. Kodirov S. A. Addictive neurons [Text] / S. A. Kodirov // *The Targets Neurol Dis.* – 2017. – Vol. 4. – P. 1498.
151. Koob G.F. Alcohol use disorders: tracts, twins, and trajectories [Text] / G.F. Koob // *Am J Psychiatry.* 2015. – Vol. 172, No. 6. – P. 499-501.
152. Koob G.F. Theoretical frameworks and mechanistic aspects of alcohol addiction: alcohol addiction as a reward deficit disorder [Text] / G.F. Koob // *Curr Top Behav Neurosci.* – 2013. – Vol. 13, No. 9. – P. 3-30.
153. Kozlovskii V.L. Endogenous factors of neurodestruction (the pharmacologic aspects) [Text] / Kozlovskii V.L. // *Farmakol. Toksikol.* – 1990. – Vol. 53, No. 5. – P. 7-13.
154. Kurch N.M. Carbohydrates metabolism disturbances when simulating prenatal alcohol intoxication [Text] / N.M. Kurch, V.E. Vysokogorskiĭ // *Biomed. Khim.* – 2013. – Vol. 59, No. 5. – P. 523-529.
155. Kyzar E.J. Molecular mechanisms of synaptic remodeling in alcoholism [Text] / E.J. Kyzar, S.C. Pandey // *Neurosci Lett.* – 2015. – No. 601. – P. 11-19.
156. Lack of improvement in cerebral metabolism after hyperoxia in severe head injury: a microdialysis study [Text] / S. Magnoni, L. Ghisoni, M. Locatelli [et. al.] // *J. Neurosurg.* – 2003. – Vol. 98, No. 5. – P. 952-958.
157. Lactate uptake by the injured human brain: evidence from an arteriovenous gradient and cerebral microdialysis study [Text] / I. Jalloh, A. Helmy, R.J. Shannon [et. al.] // *J. Neurotrauma.* – 2013. – Vol. 30, No. 24. – P. 2031-2037.

158. Landers D.F. Alcoholic coma and some associated conditions [Text] / D.F. Landers // *Am. Fam. Physician.* – 1983. – Vol. 28, No. 4. – P. 219-222.
159. Li Q. Presynaptic BK channels modulate ethanol-induced enhancement of GABAergic transmission in the rat central amygdala nucleus [Text] / Q. Li, R. Madison, S.D. Moore // *J. Neurosci.* – 2014. – Vol. 34, No. 41. – P. 13714-13724.
160. Lindsay D.B. The oxidation of glucose, ketone bodies and acetate by the brain of normal and ketonaemic sheep [Text] / D.B. Lindsay, B.P. Setchell // *J Physiol.* – 1976. – Vol. 259, No. 3. – P. 801-823.
161. Liver hepcidin mRNA expression is inappropriately low in alcoholic patients compared with healthy controls [Text] / L. Costa-Matos, P. Batista, N. Monteiro [et. al.] // *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* – 2012. – Vol. 24, No. 10. – P. 1158-1165.
162. Madhubala V. Serum carbohydrate deficient transferrin as a sensitive marker in diagnosing alcohol abuse: a case – control study [Text] / V. Madhubala, A.R. Subhashree, B. Shanthi // *J. Clin. Diagn. Res.* – 2013. – Vol. 7, No. 2. – P. 197-200.
163. Maldonado J.R. Neuropathogenesis of delirium: review of current etiologic theories and common pathways [Text] / J.R. Maldonado // *Am. J. Geriatr. Psychiatry.* – 2013. – Vol. 21, No. 12. – P. 1190-1222.
164. Maternal alcohol intake around the time of conception causes glucose intolerance and insulin insensitivity in rat offspring, which is exacerbated by a postnatal high-fat diet [Text] / E.M. Gardebjer, S.T. Anderson, M. Pantaleon [et. al.] // *ASEB J.* – 2015. – Vol. 29, No. 7. – P. 2690-2701.
165. Maternal Ethanol Consumption Alters the Epigenotype and the Phenotype of Offspring in a Mouse Model [Electronic resource] / N. Kaminen-Ahola, A. Ahol, M. Maga [et al.] // *PLoS Genet.* – 2010. – Vol.6, No. 1. – e. 1000811. Mode of access: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>
166. McGuire L.C. Alcoholic ketoacidosis [Text] / L.C. McGuire, A.M. Cruickshank, P.T. Munro // *Emerg. Med. J.* – 2006. – Vol. 23, No. 6. – P. 417-420.

167. Memory ability and hippocampal volume in adolescents with prenatal drug exposure [Text] / T. Riggins, K. Cacic, S. Buckingham-Howes [et. al.] // *Neurotoxicol. Teratol.* – 2012. – Vol. 34, No. 4. – P. 434-441.

168. Metabolic products of [$2^{(13)}\text{C}$] ethanol in the rat brain after chronic ethanol exposure [Text] / J. Wang, H. Du, X. Ma [et. al.] // *J. Neurochem.* – 2013. – Vol. 127, No. 3. – P. 353-364.

169. Metz C.E. Statistical significance tests for binormal ROC curves. [Text] / C.E. Metz, H.B. Kronman // *J. Math. Psychol.* – 1980. – Vol. 22, Issue 3. – P. 218-243.

170. MiR-497 and miR-302b regulate ethanol induced neuronal cell death through BCL2 and cyclin D2 [Text] / S. Yadav, A. Pandey, A. Shukla [et. al.] // *J. Biol. Chem.* – 2011. – Vol. 286, No. 43. – P. 37347-37357.

171. Mizuno K. Mechanisms of ethanol-induced type I IP3 receptor expression Review [Text] / K. Mizuno, K. Kurokawa, S. Ohkuma // *Nihon Shinkei Seishin Yakurigaku Zasshi.* – 2013. Vol. 33, No. 4. – P. 161-165.

172. Monte S.M. Alcohol, insulin resistance and the liver-brain axis [Text] / S.M. de la Monte, Z. Derdak, J.R. Wands // *J. Gastroenterol. Hepatol.* – 2012. – Vol. 27, Suppl. 2. – P. 33-41.

173. Monte S.M. Review of insulin and insulinlike growth factor expression, signaling, and malfunction in the central nervous system: Relevance to Alzheimer's disease [Text] / S.M. de la Monte, J.R. Wands // *J. of Alzheimer's Disease.* – 2005. – Vol. 7, No. 1. – P. 45-61.

174. Möykkynen T. Acute effects of ethanol on glutamate receptors [Text] / T. Möykkynen, E.R. Korpi // *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* – 2012. – Vol.111, No. 1. – P. 4-13.

175. Mutations at F637 in the NMDA receptor NR2A subunit M3 domain influence agonist potency, ion channel gating and alcohol action [Text] / H. Ren, A.K. Salous, J.M. Paul [et. al.] // *Br J Pharmacol.* – 2007. – Vol. 151, No. 19. – P. 749–757.

176. Mutations of gamma-aminobutyric acid and glycine receptors change alcohol cutoff: evidence for an alcohol receptor? [Text] / M.J. Wick, S.J. Mihic, S. Ueno [et. al.] // Proc Natl Acad Sci U S A. – 1998. – Vol. 95, No. 11. – P. 6504-6509.

177. Nammi S. Light-to-moderate ethanol feeding augments AMPK- α phosphorylation and attenuates SREBP-1 expression in the liver of rats [Text] / S. Nammi, B.D. Roufogalis // J. Pharm. Pharm. Sci. – 2013. – Vol. 16, No. 2. – P. 342-351.

178. Navaravong L. An obscuring cause of wide-anion-gap metabolic acidosis in alcoholic patient: an interesting case [Text] / L. Navaravong, P. Sufka, J.B. Warren // J. R. Soc. Med. – 2009. – Vol. 102, No. 7. – P. 294-295.

179. Neural Correlates of the Severity of Cocaine, Heroin, Alcohol, MDMA and Cannabis Use in Polysubstance Abusers: A Resting-PET Brain Metabolism Study [Electronic resource] / L. Moreno-López, E.A. Stamatakis, M.J. Fernández-Serrano [et. al.] // PLoS One. – 2012. – Vol. 7, No. 6. Mode of access: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>

180. Neurohumoral responses during prolonged exercise in humans [Text] / L. Nybo, B. Nielsen, E. Blomstrand [et. al.] // J. Appl. Physiol. – 2003. – Vol. 95, No. 3. – P. 1125-1131.

181. New twist on neuronal insulin receptor signaling in health, disease, and therapeutics [Text] / A. Wada, H. Yokoo, T. Yanagita, H. Kobayashi // J. Pharmacol. Sci. – 2005. – Vol. 99, No. 2. – P. 128-143.

182. Nie Z. Ethanol augments GABAergic transmission in the central amygdala via CRF1 receptors [Text] / Z. Nie, P. Schweitzer, A.J. Roberts [et. al.] // Science. – 2004. – Vol. 303, No. 5663. – P. 1512-1514.

183. Ohta K.I. Prenatal ethanol exposure impairs passive avoidance acquisition and enhances unconditioned freezing in rat offspring [Text] / K.I. Ohta, H. Sakata-Haga, Y. Fukui // Behav. Brain Res. – 2012. – Vol. 234, No. 2. – P. 255-258.

184. P2X4 receptors (P2X4Rs) represent a novel target for the development of drugs to prevent and/or treat alcohol use disorders [Text] / K.M. Franklin, L. Asatryan, M.W. Jakowec [et. al.] // Front Neurosci. – 2014. – No. 8. – P. 176.

185. Pagotto U. Where does insulin resistance start? The brain [Text] / U. Pagotto // *Diabetes Care*. – 2009. – Vol. 32, No. 2. – P. 174-177.

186. Paquot N. Alcoholism, an addiction leading to multiple somatic complications [Text] / N. Paquot, J. De Flines, A.J. Scheen // *Rev. Med. Liege*. – 2013. – Vol. 68, No. 5-6. – P. 272-280.

187. Pigula F.A. Hypothermic cardiopulmonary bypass alters oxygen/glucose uptake in the pediatric brain [Text] / F.A. Pigula, R.D. Siewers, E.M. Nemoto // *J. Thorac. Cardiovasc. Surg*. – 2001. – Vol. 121, No. 2. – P. 366-373.

188. Plawecki M.H. Metabolism [Text] / M.H. Plawecki, D.W. Crabb // *Handb. Clin. Neurol*. – 2014. – No. 125. – P. 55-69.

189. Possible implications of insulin resistance and glucose metabolism in Alzheimer's disease pathogenesis [Text] / D. Bosco, A. Fava, M. Plastino [et. al.] // *J Cell Mol Med*. – 2011. – Vol. 15, No. 9. – P. 1807-1821.

190. Postmortem differential diagnostics of diabetic and alcoholic ketoacidosis [Text] / E.P. Avramenko, O.M. Zoroastrov, M.G. Lotter [et. al.] // *Sud. Med. Ekspert*. – 2010. – Vol. 53, No. 5. – P. 36-38.

191. Posttranscriptional regulation of BK channel splice variant stability by miR-9 underlies neuroadaptation to alcohol [Text] / A.Z. Pietrzykowski, R.M. Friesen, G.E. Martin [et. al.] // *Neuron* – 2008. Vol. 59, No. 2. – P. 274-287.

192. Potential role of adolescent alcohol exposure-induced amygdaloid histone modifications in anxiety and alcohol intake during adulthood [Text] / S.C. Pandey, A.J. Sakharkar, L. Tang, H. Zhang // *Neurobiol Dis*. – 2015.

193. Predominance of D2 receptors in mediating dopamine's effects in brain metabolism: effects of alcoholism [Text] / N.D. Volkow, D. Tomasi, G.J. Wang [et. al.] // *Neurosci*. – 2013. – Vol. 33, No. 10. – P. 4527-4535.

194. Prenatal ethanol exposure alters adult hippocampal VGLUT2 expression with concomitant changes in promoter DNA methylation, H3K4 trimethylation and miR-467b-5p levels [Text] / C.R. Zhang, M.F. Ho, M.C. Vega [et. al.] // *Epigenetics Chromatin*. – 2015. – No. 8. – P. 40.

195. Prenatal ethanol exposure enhances the susceptibility to metabolic syndrome in offspring rats by HPA axis-associated neuroendocrine metabolic programming [Text] / L.P. Xia, L. Shen, H. Kou [et. al.] // *Toxicol. Lett.* – 2014. – Vol. 226, No. 1. – P. 98-105.

196. Programmed Cell Death 4 (PDCD4): A Novel Player in Ethanol-Mediated Suppression of Protein Translation in Primary Cortical Neurons and Developing Cerebral Cortex [Text] / M. Narasimhan, M. Rathinam, A. Riar [et. al.] // *Alcohol Clin. Exp. Res.* – 2013. – Vol. 37, No. 1. – P. 96-109.

197. Protective effects of dioscin against alcohol-induced liver injury [Text] / T. Xu, L. Zheng, L. Xu [et. al.] // *Arch. Toxicol.* – 2014. – Vol. 88, No. 3. – P. 739-753.

198. Prunell G.F. Experimental subarachnoid hemorrhage: cerebral blood flow and brain metabolism during the acute phase in three different models in the rat [Text] / G.F. Prunell, T. Mathiesen, N.A. Svendgaard // *Neurosurgery.* – 2004. – Vol. 54, No. 2. – P. 426-436.

199. Qin L. Chronic ethanol increases systemic TLR3 agonist-induced neuroinflammation and neurodegeneration [Text] / L. Qin, F.T. Crews // *J. Neuroinflammation.* – 2012. – No. 9. – P. 130.

200. Reduced glial and neuronal packing density in the orbitofrontal cortex in alcohol dependence and its relationship with suicide and duration of alcohol dependence [Text] / J.J. Hidalgo, J.C. Overholser, H.Y. Meltzer [et. al.] // *Alcohol Clin Exp Res.* – 2006. – Vol. 30, No. 11. – P. 1845-1855.

201. Rehman H.U. A woman with ketoacidosis but not diabetes / H.U. Rehman // *BMJ.* – 2012. – No. 344. – P. e1535.

202. Repeated intoxication presenting with azotemia, elevated serum osmolal gap, and metabolic acidosis with high anion gap: differential diagnosis, management, and prognosis [Text] / M. Prevost, Y. Sun, K.S. Servilla [et. al.] // *Int. Urol. Nephrol.* – 2012. Vol. 44, No. 1. – P. 309-314.

203. Sibai K. Alcoholic ketoacidosis: not rare cause of metabolic acidosis [Text] / K. Sibai, P. Eggimann // *Rev. Med Suisse.* – 2005. – Vol. 1, No. 32. – P. 2106-2115.

204. Roth T.L. Epigenetic Regulation of Genes in Learning and Memory [Text] / T.L. Roth, E.D. Roth, J.D. Sweatt // *Essays in Biochemistry*. – 2010. – Vol. 48. – No. 1. – P. 263-274.

205. Rutin upregulates neurotrophic factors resulting in attenuation of ethanol-induced oxidative stress in HT22 hippocampal neuronal cells [Text] / K. Song, J.Y. Na, S. Kim [et. al.] // *J. Sci. Food Agric.* – 2015. – Vol 95, No. 10. – P. 2117-2123.

206. Sananbenesi F. The epigenetic bottleneck of neurodegenerative and psychiatric diseases [Text] / F. Sananbenesi, A. Fischer // *Biol Chem.* – 2009. – Vol. 390, No. 11. – P. 1145-1153.

207. Selective increases of AMPA, NMDA, and kainate receptor subunit mRNAs in the hippocampus and orbitofrontal cortex but not in prefrontal cortex of human alcoholics [Text] / Z. Jin, A.K. Bhandage, I. Bazov [et. al.] // *Front Cell Neurosci.* – 2014. – No. 1. – P. 8-11.

208. Selective modulation of GABAergic tonic current by dopamine in the nucleus accumbens of alcohol-dependent rats [Text] / J. Liang, V.N. Marty, Y. Mulpuri [et. al.] // *J. Neurophysiol.* – 2014. – Vol. 112, No. 1. – P. 51-60.

209. Sodium oxybate in maintaining alcohol abstinence in alcoholic patients according to Lesch typologies: a pilot study [Text] / F. Caputo, A. Del Re, R. Brambilla [et. al.] // *J. Psychopharmacol.* – 2014. – Vol. 28, No. 1. – P. 23-30.

210. Sonne M.E. Severe metabolic acidosis in an alcoholic [Text] / M.E. Sonne, S.F. Rudolph, F.C. Pott // *Ugeskr Laeger.* – 2008. – Vol. 170, No. 40. – P. 3150-3152.

211. Smothers C.T. Effects of amino acid substitutions in transmembrane domains of the NR1 subunit on the ethanol inhibition of recombinant N-methyl-D-aspartate receptors [Text] / C.T. Smothers, J.J. Woodward // *Alcohol Clin Exp Res.* – 2006. – Vol. 30, No. 3. – P. 523-530.

212. Specific Conditions for Resveratrol Neuroprotection against Ethanol-Induced Toxicity [Electronic resource] / B. Gonthier, N. Allibe, C. Cottet-Rousselle [et. al.] // *J. Toxicol.* – 2012. – e. 973134. Mode of access: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>

213. Stahl S.M. Psychotherapy as an epigenetic "drug": psychiatric therapeutics target symptoms linked to malfunctioning brain circuits with psychotherapy as well as with drugs [Text] / S.M. Stahl // *Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics*. – 2012. – Vol. 37, No. 3. – P. 249-253.

214. Tabakoff B. The neurobiology of alcohol consumption and alcoholism: an integrative history [Text] / B. Tabakoff, P.L. Hoffman // *Pharmacol Biochem Behav*. – 2013. – No. 113. – P. 20-37.

215. Ten-year stability of remission in private alcohol and drug outpatient treatment: non-problem users versus abstainers [Text] / J.R. Mertens, A.H. Kline-Simon, K.L. Delucchi [et. al.] // *Drug Alcohol Depend*. – 2012. – Vol. 125, No. 1-2. – P. 67-74.

216. The cerebral cortex is damaged in chronic alcoholics [Text] / J.J. Kril, G.M. Halliday, M.D. Svoboda, H. Cartwright // *Neuroscience*. – 1997. – Vol.79, No. 4. – P. 983-998.

217. The glycolytic enzyme, GPI, is a functionally conserved modifier of dopaminergic neurodegeneration in Parkinson's models [Text] / A.L. Knight, X.S. Yan, S. Hamamichi [et. al.] // *Cell Metab*. – 2014. – Vol. 20, No. 1. – P. 145-157.

218.

219. The role of glycerol-3-phosphate dehydrogenase 1 in the progression of fatty liver after acute ethanol administration in mice [Text] / T. Sato, A. Morita, N. Mori [et. al.] // *Biochem. Biophys. Res. Commun*. – 2014. – Vol. 44, No. 4. – P. 525-530.

220. Tsai Y.C. Immobilization of lactate dehydrogenase within multiwalled carbon nanotube-chitosan nanocomposite for application to lactate biosensors [Text] / Y.C. Tsai, S.Y. Chen, H.W. Liaw // *Sensors and Actuators B: Chemical*. – 2007. – Vol. 2. – P. 474-481.

221. Up-regulation of microRNA-155 in macrophages contributes to increased tumor necrosis factor α (TNF α) production via increased mRNA half-life in alcoholic liver disease [Text] / S. Bala, M. Marcos, K. Kodys [et. al.] // *J. Biol. Chem*. – 2011. – Vol. 286, No. 2. – P. 1436-1444.

222. Vendruscolo L.F. Corticosteroid-dependent plasticity mediates compulsive alcohol drinking in rats [Text] / L.F. Vendruscolo, E. Barbier, J.E. Schlosburg // *J. Neurosci.* – 2012. – Vol. 32, No. 22. – P. 7563-7571.
223. Wernicke encephalopathy in alcoholics with diabetic ketoacidosis [Text] / A.J. Chamorro, M. Marcos-Martin, J. Martin-Polo [et. al.] // *Intern. Med.* – 2009. – Vol. 48, No. 13. – P. 1187-1189.
224. Widmark E. M. P. Die theoretischen Grundlagen und die praktische Verwendbarkeit der gerichtlich-medizinischen Alkoholbestimmung [Electronic resource] / E. M. P. Widmark // Urban & Schwarzenberg, Berlin Wien, 1932. – Mode of access: <https://ru.wikipedia.org/wiki/>
225. Williamson R. Insulin resistance in the brain: an old-age or new-age problem? [Text] / R. Williamson, A. McNeilly, C. Sutherland // *Biochem Pharmacol.* – 2012. – Vol. 84, No. 6. – P. 737-745.
226. Yahn S.L. Safety and efficacy of acamprosate for the treatment of alcohol dependence [Text] / S.L. Yahn, L.R. Watterson, M.F. Olive // *Subst Abuse.* – 2013. – Vol.76, No. 6. – P.1-12.
227. Yang X. Alcohol dependence mediated by monoamine neurotransmitters in the central nervous system [Text] / X. Yang, H. Zhang, J. Lai // *Yi. Chuan.* – 2014. – Vol. 36, No. 1. – P. 11-20.
228. Zhou C. Basal renal tubular epithelial cell vacuolization and alcoholic ketoacidosis [Text] / C. Zhou, R.W. Byard // *J. Forensic. Sci.* – 2012. – Vol. 57, No. 1. – P. 126-128.
229. Zou J. Inflammasome-IL-1 β Signaling Mediates Ethanol Inhibition of Hippocampal Neurogenesis [Text] / J. Zou, F.T. Crews // *Front. Neurosci.* – 2012. – No. 6. – P. 77.

ПРИЛОЖЕНИЯ

Приложение 1

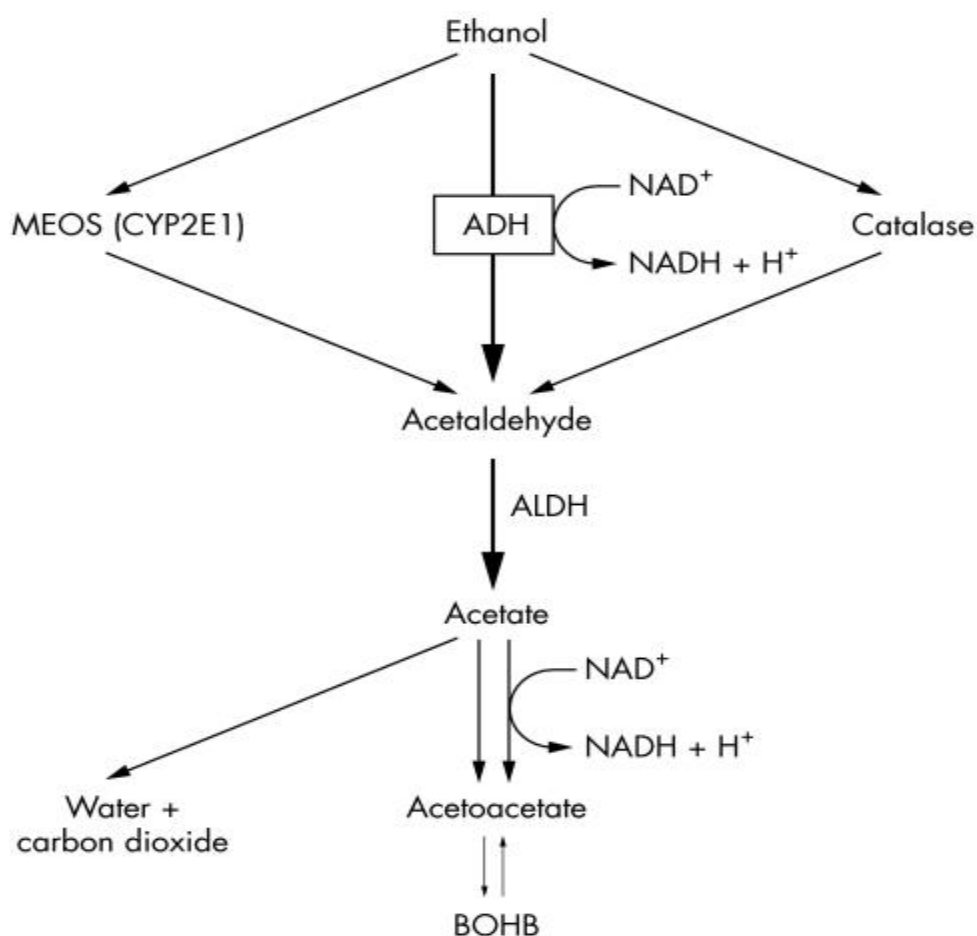


Рисунок 1.1. Возможные пути метаболизма этанола и ацетальдегида в организме

Ферменты превращения этанола: алкогольдегидрогеназа (ADH), каталаза (Catalase), микросомальная система окисления этанола (MEOS). Фермент превращения ацетальдегида: альдегиддегидрогеназа (ALDH). Конечным продуктом метаболизма этанола является кетонное тело – ацетоацетат.

Источник цитирования: McGuire L.C. Alcoholic ketoacidosis [Text] / L.C. McGuire, A.M. Cruickshank, P.T. Munro // Emerg. Med. J. – 2006. – Vol. 23, No. 6. – P. 417-420.

Приложение 2



Рисунок 2.1. Пути утилизации ацетил-КоА

Использование Ацетил-КоА для энергетических целей (окисление в ЦТК) и для пластических целей (образование кетоновых тел, жирных кислот и т.др.)

Источник цитирования: Биохимия печени. [Электронный ресурс]. – Режим доступа: www.dendrit.ru/files/005biohim24.gif

Приложение 3

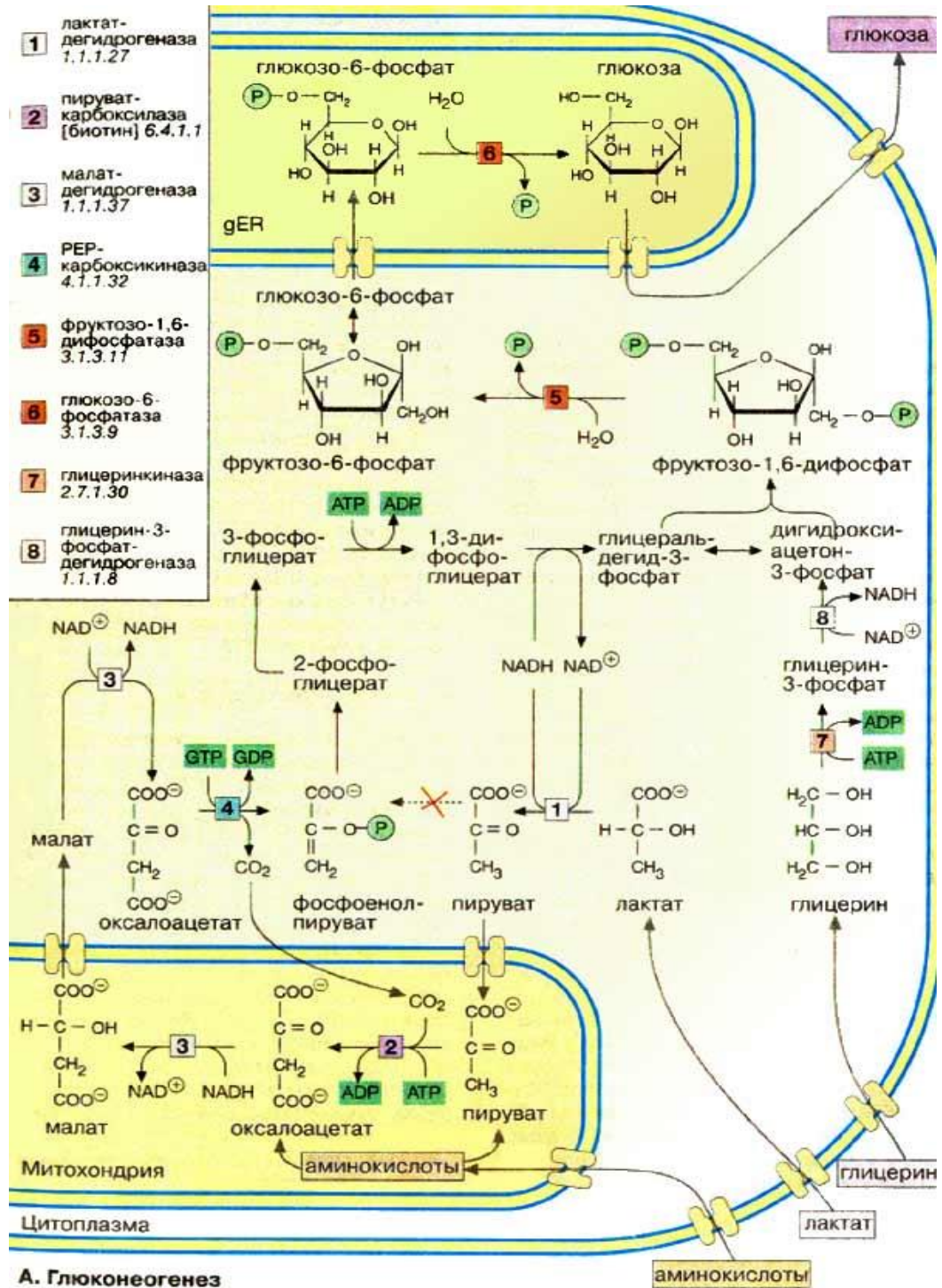


Рисунок 3.1. Образование глюкозы в организме – глюконеогенез

НАД-зависимые ферменты глюконеогенеза: ЛДГ, Г-6-ФДГ, малатдегидрогеназа.

Источник цитирования: Биохимия. Глюконеогенез. [Электронный ресурс]. – Режим доступа: www.xumuk.ru/biochem/156.html

Приложение 4

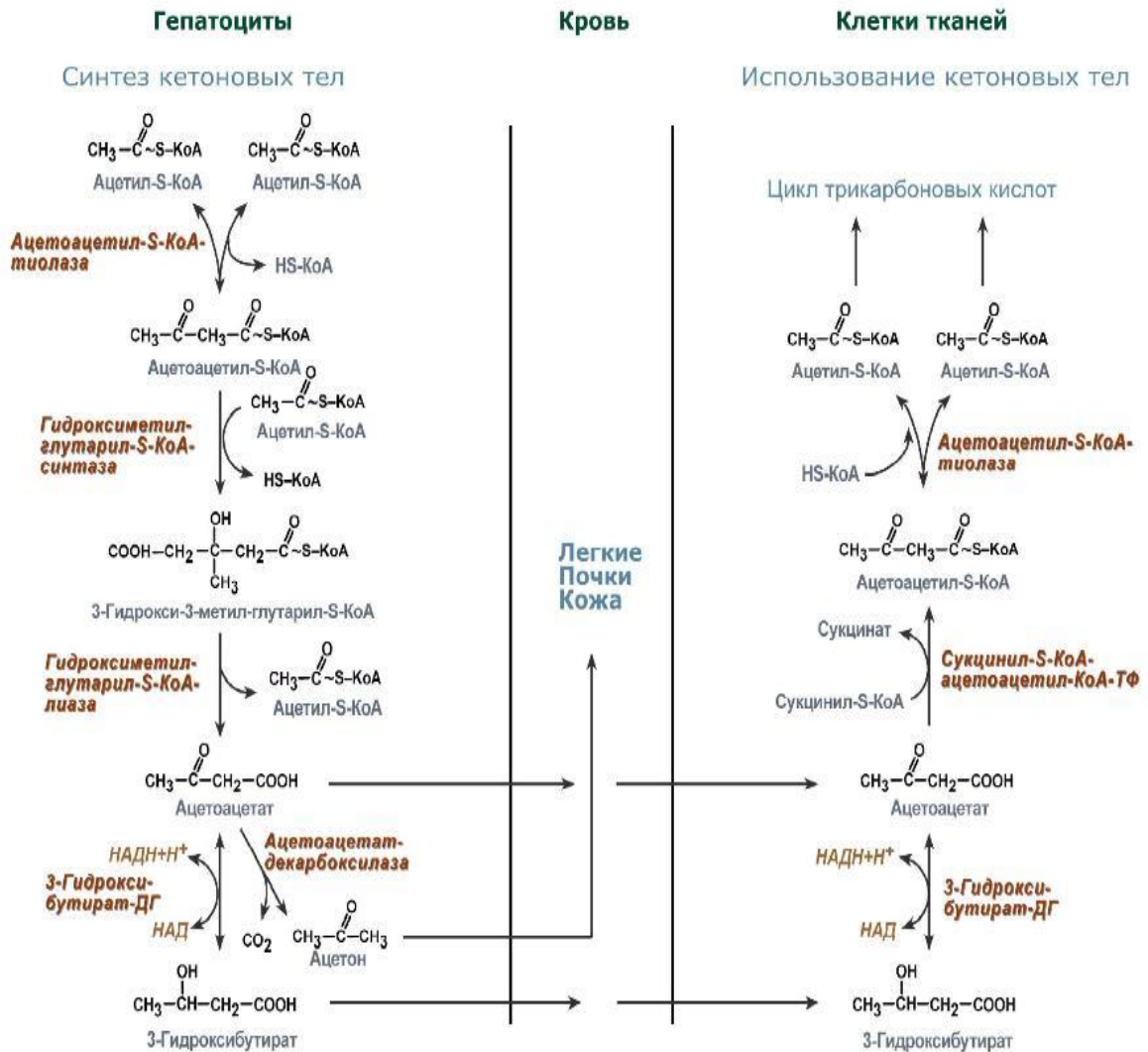


Рисунок 4.1. Метаболизм кетоновых тел в организме

В цитоплазме клетки при превращении 3-гидроксибутирата в ацетоацетил-S-CoA образуется 3 молекулы АТФ. В митохондриях образуется 24 (12 x 2) молекул АТФ. Одна молекула используется на транспорт через мембрану митохондрии. Следовательно, максимальный суммарный выход АТФ при окислении кетоновых тел – 26 молекул АТФ.

Источник цитирования: Биохимия. Синтез кетоновых тел. [Электронный ресурс]. – Режим доступа: www.biochemistry.terra-medica.ru/lekcii-po-biohimii

Приложение 5

Таблица 5.1

Содержание глюкозы в крови из хвостовой вены крыс опытных групп (n = 60) в однодневном эксперименте в разные сроки принудительной алкоголизации

| Срок алкоголизации | Концентрация глюкозы: М±m (95 % ДИ), ммоль/л |
|--------------------|--|
| До начала | 7,01±0,17 (6,67-7,34) |
| 21 сутки | 3,20±0,12* (2,95-3,45) |
| 42 сутки | 3,18±0,11* (2,96-3,40) |
| 84 сутки | 3,09±0,11* (2,87-3,32) |
| 112 сутки | 3,00±0,13* (2,75-3,26) |

* - $p < 0,05$ по сравнению с показателем до начала принудительной алкоголизации

Таблица 5.2

Влияние принудительной алкоголизации на содержание кетоновых тел в моче

| Категория степени кетонурии | Количественный показатель степени кетонурии, ммоль/л | Количество крыс с данной степенью кетонурии, особей | |
|-----------------------------|--|---|-------------------------------|
| | | До начала алкоголизации | После окончания алкоголизации |
| 0 | Нет кетонов | 60 | 0 |
| 1 | до 0,5 ммоль/л | 0 | 4 |
| 2 | 0,6-1,5 ммоль/л | 0 | 7 |
| 3 | 1,6-3,9 ммоль/л | 0 | 38 |
| 4 | 4,0-10 ммоль/л | 0 | 11 |

Приложение 6

Таблица 6.1

Питьевое поведение крыс опытной группы (n = 60)
в период принудительной алкоголизации, в условиях свободного выбора

| Этапы принудительной алкоголизации | Количество выпитого, М±m (95 % ДИ), мл / 0,1 кг / сут | | | |
|--|---|----------------------------|-----------------------------|--------------------------|
| | Воды | 5 % глюкозы | 10 % этанола | Всего жидкости |
| До начала | 2,33±0,03 (2,26-2,40) | 1,50 ± 0,08 (1,34-1,65) | 0±0,00 (0,00-0,00) | 3,85±0,11 (3,64-4,07) |
| 21 день | 0,73±0,04 (0,65-0,81) | 1,08±0,04 (1,00-1,16) | 4,88±0,10 (4,68 - 5,08)* | 6,70±0,08 (6,54-6,85) |
| 42 день | 0,56±0,03 (0,49-0,63) | 0,72±0,03 (0,65-0,79) | 5,74±0,08 (5,58 – 5,90)* | 7,00±0,07 (6,86-7,14) |
| 84 день | 0,44±0,02 (0,40-0,52) | 0,40±0,03 (0,38-0,46) | 6,26±0,15 (6,06 - 6,46) | 7,06±0,06 (6,94-7,19) |
| 112 день | 0,42±0,03 (0,36-0,48) | 0,28±0,03 (0,23-0,34) | 6,44±0,08 (6,28-6,60) | 7,12±0,06 (7,00-7,25) |

* - $p < 0,05$ по отношению к показателям до начала эксперимента

& - $p < 0,05$ по отношению к показателям предыдущего этапа алкоголизации

Приложение 7

Таблица 7.1

Характеристика употребления различных видов жидкостей в условиях свободного выбора питья в ходе метаболической коррекции и уровня гликемии у крыс различных подопытных и контрольных групп ($M \pm m$)

| Группы | Потребление жидкости, мл / 0,1 кг | | | | Уровень глюкозы крови, ммоль/л |
|---------------------|-----------------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------------|
| | 10 % этанола | 5 % глюкозы | воды | всего | |
| 10-й день коррекции | | | | | |
| 1а (n=10) | 4,5±0,3 ^{1,3} | 0,2±0,1 ³ | 0,5±0,4 ³ | 5,2±0,6 ^{1,3} | 6,0±0,4 ^{1,3} |
| 2а (n=10) | 5,1±0,4 ⁴ | 0,2±0,1 ⁴ | 0,8±0,1 ⁴ | 6,0±0,5 ⁴ | 3,6±0,3 ⁴ |
| 3а (n=10) | 5,2±0,4 ⁵ | 0,1±0,1 ⁴ | 0,5±0,1 ⁵ | 6,1±0,4 | 6,0±0,4 ^{1,5} |
| 4а (n=10) | 5,5±0,3 ³ | 0,2±0,2 ³ | 0,6±0,3 ³ | 6,3±0,8 ³ | 3,0±0,2 ³ |
| 1к (n=10) | 0,0 ±0,0 | 1,3±0,3 | 2,3±0,6 | 3,6±0,5 | 7,5±0,6 |
| 2к (n=10) | 0,0 ±0,0 | 1,2±0,3 | 2,6±0,6 | 3,5±0,5 | 7,4±0,5 |
| 20-й день коррекции | | | | | |
| 1а (n=10) | 3,2±0,4 ^{1,2,3} | 0,3±0,2 ^{1,3} | 0,7±0,4 ^{2,3} | 4,2±0,4 ^{1,2,3} | 6,1±0,6 ^{1,3} |
| 2а (n=10) | 4,3±0,3 ^{2,4} | 0,2±0,1 ⁴ | 0,6±0,1 ⁴ | 4,7±0,5 ⁴ | 3,8±0,3 ⁴ |
| 3а (n=10) | 3,1±0,4 ^{1,2,5} | 0,2±0,1 ⁵ | 0,7±0,1 ⁵ | 4,1±0,5 | 6,0±0,5 ^{1,5} |
| 4а (n=10) | 4,5±0,3 ^{2,3} | 0,2±0,1 ³ | 0,7±0,5 ³ | 5,4±0,5 ³ | 3,2±0,2 ³ |
| 1к (n=10) | 0,0 ±0,0 | 1,5±0,3 | 2,3±0,5 | 3,7±0,7 | 7,5±0,4 |
| 2к (n=10) | 0,0 ±0,0 | 1,3±0,3 | 2,5±0,6 | 3,8±0,6 | 7,1±0,6 |
| 30-й день коррекции | | | | | |
| 1а (n=10) | 2,7±0,3 ^{1,2,3} | 0,7±0,3 ^{1,2,3} | 1,0±0,4 ^{1,2,3} | 4,4±0,6 ¹ | 7,1±0,4 ^{1,2} |
| 2а (n=10) | 5,1±0,3 ^{2,4} | 0,3±0,1 ⁴ | 0,7±0,1 ⁴ | 6,3±0,4 ⁴ | 4,0±0,3 ⁴ |
| 3а (n=10) | 3,5±0,5 ^{1,5} | 0,5±0,2 ^{1,2,5} | 0,8±0,1 ⁵ | 4,8±0,5 | 7,1±0,3 ^{1,2} |

| | | | | | |
|--------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|
| 4а (n=10) | 4,5±0,4 ³ | 0,3±0,1 ³ | 0,7±0,4 ³ | 5,3±0,5 ³ | 3,5±0,3 ³ |
| 1к (n=10) | 0,0 ±0,0 | 1,5±0,4 | 2,7±0,4 | 4,2±0,5 | 7,4±0,6 |
| 2к (n=10) | 0,0 ±0,0 | 1,7±0,6 | 2,6±0,4 | 4,3±0,4 | 7,2±0,6 |

Примечания:

¹ – $p < 0,01$ в сравнении с показателями 4а группы;

² – $p < 0,01$ в сравнении с показателями предшествующего контрольного периода;

³ – $p < 0,01$ в сравнении с показателями 1к группы;

⁴ – $p < 0,01$ в сравнении с показателями 2к группы;

⁵ – $p < 0,01$ в сравнении с показателями 3к группы.

Приложение 8

Таблица 8.1

Распределение животных с различным уровнем кетонурии в группах подопытных животных 1а-4а в отчетные периоды метаболической коррекции (М% ±m %, (абс.зн.))

| Группы | Степень кетонурии | | | | |
|---------------------|-------------------|------------------------|--------------------|--------------------|---------------------|
| | – нет кетонов | ± до 0,5 ммоль/л | + | ++ | +++ |
| | | | 0,6-1,5 ммоль/л | 1,6-3,9 ммоль/л | 1,7-10,0 ммоль/л |
| 10-й день коррекции | | | | | |
| 1а (n=10) | 50±15,8 (5) | 40±15,5 (4) | 10±9,5 (1) | 0 | 0 |
| 2а (n=10) | 10±9,5 (1) | 60±15,5 (6) | 30±14,5 (3) | 0 | 0 |
| 3а (n=10) | 50±15,8 (5) | 30±14,5 (3) | 10±9,5 (1) | 10±9,5 (1) | 0 |
| 4а (n=10) | 0 | 10±9,5 (1) | 70±14,5 (7) | 20±12,6 (2) | 0 |
| 20-й день коррекции | | | | | |
| 1а (n=10) | 70±14,5 (7) | 30±14,5 (3) | 0 | 0 | 0 |
| 2а (n=10) | 20±12,6 (2) | 70±14,5 (7) | 10±9,5 (1) | 0 | 0 |
| 3а (n=10) | 70±14,5 (7) | 30±14,5 (3) | 0 | 0 | 0 |
| 4а (n=10) | 0 | 20±12,6 (2) | 70±14,5 (7) | 10±9,5 (1) | 0 |
| 30-й день коррекции | | | | | |
| 1а (n=10) | 80±12,6 (8) | 20±12,6 (2) | 0 | 0 | 0 |
| 2а (n=10) | 20±12,6 (2) | 60±15,5 (6) | 20±12,6 (2) | 0 | 0 |
| 3а (n=10) | 70±14,5 (7) | 30±14,5 (3) | 0 | 0 | 0 |
| 4а (n=10) | 10±9,5 (1) | 80±12,6 (8) | 10±9,5 (1) | 0 | 0 |

Примечания:

1а группа – алкоголизованные крысы + крахмал

2а группа – алкоголизованные крысы + унитиол

3а группа – алкоголизованные крысы + унитиол + крахмал

4а группа – группа сравнения – алкоголизованные крысы + 0,9 % NaCl

Приложение 9

Таблица 9.1

Суточная динамика уровня кетонурии и потребления этанола в условиях свободного выбора у крыс 5а группы в течение 3-х дней эксперимента

| Время контро ля | Распределение случаев кетонурии разной степени выраженности, % | | | | | | | | | | Количество выпитого алкоголя, мл/100 г, М±m | |
|--------------------------------------|--|----|----|----|-----|------------------|---|----|----|-----|---|-----------------------|
| | 5а группа (n=30) | | | | | 6а группа (n=30) | | | | | 5а группа (n=30) | 6а группа (n = 30) |
| | - | ± | + | ++ | +++ | - | ± | + | ++ | +++ | | |
| 9.00 | 83 | 13 | 3 | 0 | 0 | 0 | 0 | 20 | 80 | 0 | 0 | 0 |
| 10.00 | 0 | 60 | 37 | 3 | 0 | 0 | 0 | 10 | 70 | 20 | 2,4±0,6 | 0,8±0,6 |
| 11.00 | 0 | 0 | 30 | 63 | 7 | 0 | 0 | 10 | 70 | 20 | 0,5±0,5* | 0,7±0,5 |
| 12.00 | 0 | 0 | 7 | 70 | 23 | 0 | 0 | 10 | 70 | 20 | 0,8±0,4* | 0,8±0,5 |
| 13.00 | 0 | 0 | 10 | 67 | 23 | 0 | 0 | 10 | 67 | 23 | 0,5±0,3* | 0,7±0,5 |
| 14.00 | 0 | 0 | 10 | 67 | 23 | 0 | 0 | 10 | 67 | 23 | 0,4±0,3* | 0,8±0,5 |
| 15.00 | 0 | 0 | 10 | 70 | 20 | 0 | 0 | 10 | 70 | 20 | 0,4±0,4* | 0,8±0,5 |
| 16.00 | 0 | 0 | 10 | 70 | 20 | 0 | 0 | 10 | 70 | 20 | 0,5±0,3* | 0,8±0,6 |
| 17.00 | 0 | 0 | 10 | 70 | 20 | 0 | 0 | 10 | 70 | 20 | 0,5±0,5* | 0,7±0,5 |
| Суммарное потребление (09.00-17.00): | | | | | | | | | | | 6,1±0,3 | 6,1±0,1 |

Примечание: *- статистически значимое отличие внутри одной группы, по сравнению с показателем на 10.00 (09.00-10.00).