ISSN 0206-5657. Вісник Львівського університету. Серія біологічна. 2013. Випуск 62. С. 285–293
Visnyk of the Lviv University. Series BIology. 2013. Issue 62. P. 285–293

УДК 57.024+591.512.16+612.821.44+615.31

ВПЛИВ N-СТЕАРОЇЛЕТАНОЛАМІНУ ТА ХРОНІЧНОЇ АЛКОГОЛІЗАЦІЇ НА ПОВЕДІНКУ ЩУРІВ У ТЕСТІ «ВІДКРИТЕ ПОЛЕ»

О. Бондаренко[1*], Н. Гула[2], М. Макарчук[1], Т. Горідько[2], В. Бабан[1], О. Коваленко[1]

[1]Київський національний університет імені Тараса Шевченка,
ННЦ «Інститут біології»
просп. Академіка Глушкова, 2, корп. 12, Київ 03022, Україна
[2]Інститут біохімії імені О.В. Палладіна НАНУ
вул. Леонтовича, 9, Київ 01601, Україна
e-mail: bondarenko__oleksandr@ukr.net

Досліджували поведінку щурів у тесті «відкрите поле» після алкоголізації та введення N-стеароїлетаноламіну (NSE). Виявлено, що алкоголь, NSE та їхнє поєднання здатні змінювати поведінку щурів у відкритому полі. З'ясовано, що введення NSE в дозі 5 мг/кг протягом 7 днів пригнічує локомоторну та вертикальну активність щурів і не впливає на показники емоційної активності (тривалості грумінгу). Введення NSE в останні 7 днів хронічної 30-денної алкоголізації дещо знижує мотивацію щодо споживання етанолу щурами за умов вільного вибору, але при цьому не виявлено суттєвої різниці в поведінці у відкритому полі алкоголізованих тварин і тварин, які на фоні алкоголю отримували NSE.

Ключові слова: N-стеароїлетаноламін, тест «відкрите поле», поведінка, алкоголь, залежність.

Алкоголь є однією з найбільш часто вживаних речовин, яка здатна викликати у людини наркотичну залежність, що, у свою чергу, сприяє виникненню різноманітних медичних і соціально-економічних проблем [9]. Усе це зумовлює нагальну необхідність пошуку речовин, які або протидіяли би формуванню такої залежності, або зменшували б імовірність її розвитку. Нині найбільшу увагу і сподівання на вирішення цієї проблеми покладають на дослідження функціонування ендоканабіноїдної системи мозку. Справа в тому, що ця система разом із опіоїдною системою бере участь у регуляції низки фізіологічних процесів, таких як ноцицепція і винагородження (reward). На сьогодні накопичено значний експериментальний і клінічний матеріал, який засвідчує, що ендоканабіноїди впливають на виникнення толерантності/залежності не лише від екзогенних канабіноїдів (Δ^9-тетрагідроканабінолу), а й від інших сполук, здатних викликати залежність, зокрема алкоголю і морфіну. Встановлено тісний функціональний зв'язок між канабіноїдною й опіоїдною рецепторними системами, кожна з яких бере участь у регуляції мотивації щодо вживання алкоголю [з книги 5].

Локалізація канабіноїдних рецепторів у лімбічній системі головного мозку є свідченням того, що ендоканабіноїди виступають природними модуляторами обробки емоційної інформації [11], а відповідно можуть включатися в систему формування будь-якої залежності, включаючи й алкогольну. Доказом такого зв'язку можуть бути і дані про те, що хронічне вживання етанолу підвищує рівень ендогенних лігандів канабіноїдних рецепторів, зокрема анандаміду (АЕА) в клітинах нейробластоми [9]. Важливо підкреслити і те, що канабіноїдні препарати, діючи на канабіноїдну систему мозку, здатні модулювати діяльність не лише емоційної сфери, а й основні когнітивні функції, справляти нейропротекторну дію, що опосередковуються активацією CB1-рецепторів [12]. Дослідження ендо-

© Бондаренко О., Гула Н., Макарчук М. та ін., 2013

канабіноїдної системи мозку показали, що поряд із найбільш вивченим на сьогодні анандамідом у мозкові синтезується низка інших N-ацилетаноламінів, функціональні властивості яких не цілком з'ясовані [4]. Однією із таких сполук є N-стеароїлетаноламін (NSE), який входить до групи N-ацилетаноламінів – ацильних похідних моноетаноламіну. Вміст NSE у мозкові мишей і людини становить близько 11–14% від загальної кількості ендоканабіноїдів, тоді як вміст анандаміду не перевищує 7% [10]. NSE виявляє певні канабіміметичні властивості, однак для нього не встановлено зв'язування з канабіноїдними рецепторами. Разом з тим, введення цієї сполуки здатне викликати різноманітні фізіологічні ефекти, зокрема, вже доведено мембраностабілізуючу, кардіопротекторну дію NSE за ішемії-реперфузії міокарда, а також пригнічення вільнорадикального окислення ліпідів [з книги 5, 3].

Виходячи з цього, цілком актуальним є дослідження можливості використання NSE як нейропротекторного агента при інтоксикаціях ЦНС, зокрема при алкогольній залежності.

Метою роботи було вивчення динаміки поведінкових змін у щурів за нормальних умов та після впливу алкоголю і NSE.

Матеріали та методи

Досліди були проведені в умовах хронічного експерименту на 85 білих нелінійних щурах-самцях масою 150–200 г. Найбільш поширеним та інформативним тестом для визначення впливу екзогенних речовин на емоційний стан і рухову активність тварин є тест «Відкрите поле» (ВП) [2]. Даний тест є достатнім для первинного скринінгу, а також є адекватним для виявлення токсичності препаратів. У даній установці ми реєстрували такі показники: кількість центральних і периферичних квадратів, які були перетнуті – горизонтальні рухова (локомоторна) активність; підняття на задні лапи (стійки) – вертикальна рухова активність, дослідницька активність; кількість і тривалість грумінгу – емоційна активність. До початку введення будь-яких речовин усі тварини тестувалися у відкритому полі для розподілу й утворення п'яти зрівноважених за основними показниками груп:.

I група – «Контроль інтакт» (n=16) – інтактні тварини;

II група –«Контроль зонд» (n=16) – тварини, які 7 днів отримували воду через зонд;

III група – «NSE» (n=17) – тварини, які 7 днів отримували NSE через зонд;

IV група – «Алкоголь» (n=18) – щури з моделлю хронічної 30-денної АІ;

V група – «Алкоголь + NSE» (n=18) – щури, які останні 7 діб 30-денної алкоголізації отримували водну суспензію NSE.

Тварин I, II та III групи утримували на стандартному раціоні віварію і вільному доступі до води та їжі. Тварини IV та V групи протягом періоду введення алкоголю обмежувались у доступі до води, але без харчової депривації протягом усього експерименту.

Хронічну алкогольну інтоксикацію (АІ) здійснювали у два етапи.

На I етапі визначали схильність щурів до етанолу за допомогою «двопляшкового» методу. Тварин, які не мали до цього контакту з етанолом, саджали на 14 діб в індивідуальні клітки, що були оснащені двома поїлками: одна з водою, інша з 15% розчином етанолу. Протягом цієї фази тварини впродовж 24 годин мали вільний вибір між розчином етанолу та водою.

На II етапі здійснювали примусову алкоголізацію шляхом введення тваринам етанолу як єдиного джерела рідини впродовж місяця. Через 30 днів для оцінювання індивідуального рівня вживання алкоголю кожну тварину на 4 дні саджали в індивідуальну клітку з двома поїлками (одна з водою, інша з 15% розчином етанолу). Розташування поїлок змінювали для виключення формування умовного рефлексу на їх певне положення, при цьому враховували індивідуальний об'єм випитого спирту за одиницю часу (г/кг/добу) та відсоткове співвідношення випитого спирту до об'єму всієї рідини [6].

Водну суспензію NSE, яка була синтезована, у відділі біохімії ліпідів Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАНУ, вводили тваринам інтрагастрально, використовуючи пластиковий зонд із розрахунку 5 мг/кг маси тіла, протягом 7 днів. Введення речовини за допомогою тонкого та гнучкого пластикового зонду не є травматичним для щурів і дає змогу без зайвих інструментів для фіксування в нерухомому положенні тварини швидко ввести екзогенну речовину безпосередньо у шлунок. Тварини після швидкого звикання до подібної маніпуляції практично зовсім не стресуються, що є важливим для дослідження поведінкових реакцій. Для перевірки впливу процедури введення речовини через пластиковий зонд на поведінкові показники окремій групі щурів вводили воду.

Після закінчення алкоголізації та введення NSE проводили повторне тестування у ВП.

Для статистичного аналізу даних використовували програму Statistica for Windows 7.0 (StatSoft). За критерієм Шапіро-Вілка було визначено, що вибірки даних активності поведінки належать до ненормально розподілених, а вибірки даних показників індивідуального вживання алкоголю – до нормально розподілених. При ненормальному розподілі для порівняння незалежних вибірок кількісних даних (між групами в один із досліджуваних днів) використовували критерій Манна–Вітні, для порівняння зв'язаних вибірок кількісних даних – тест Вілкоксона та представляли у вигляді медіани та 25 і 75% квартилів. Нормально розподілені вибірки обробляли за допомогою параметричного t-критерію Стьюдента. Критичний рівень значущості при перевірці статистичних гіпотез приймали рівним 0,05.

Результати і їхнє обговорення

Повторне тестування тварин у ВП після завершення алкоголізації та введення NSE показало, що тварини III групи, яким вводили NSE, мали достовірно ($p<0,01$) нижчий рівень локомоторної активності порівняно з тваринами I, II і V груп. Тоді як така різниця між тваринами III та IV груп була на рівні тенденції ($p=0,09$). При цьому важливо підкреслити, що у тварин III, IV, V груп локомоторна активність при повторному тестуванні достовірно знижувалась ($p<0,01$) порівняно з вихідним тестуванням (рис. 1).

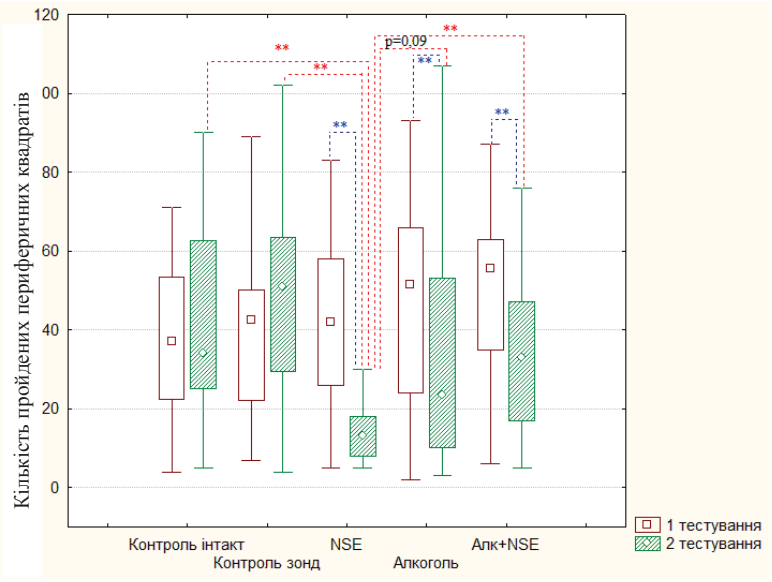

Рис. 1. Локомоторна активність (кількість пройдених периферичних квадратів) тварин під час тестування у ВП.

Що стосується кількості внутрішніх квадратів, пройдених тваринами за час перебування у відкритому полі, то статистично значущої різниці між групами як у першому, так і в повторному тестуваннях не виявлено. Хоча при повторному тестуванні їхня кількість дещо збільшується в контрольних групах щурів і знижується у тварин усіх трьох експериментальних груп.

Показник вертикальної активності щурів (кількість стійок на стіну) при повторному тестуванні достовірно ($p<0,05$) знижувався у всіх групах, порівняно з першим тестуванням. При цьому, при повторному тестуванні у щурів III групи цей показник був достовірно нижчим порівняно з інтактними тваринами I групи (рис. 2).

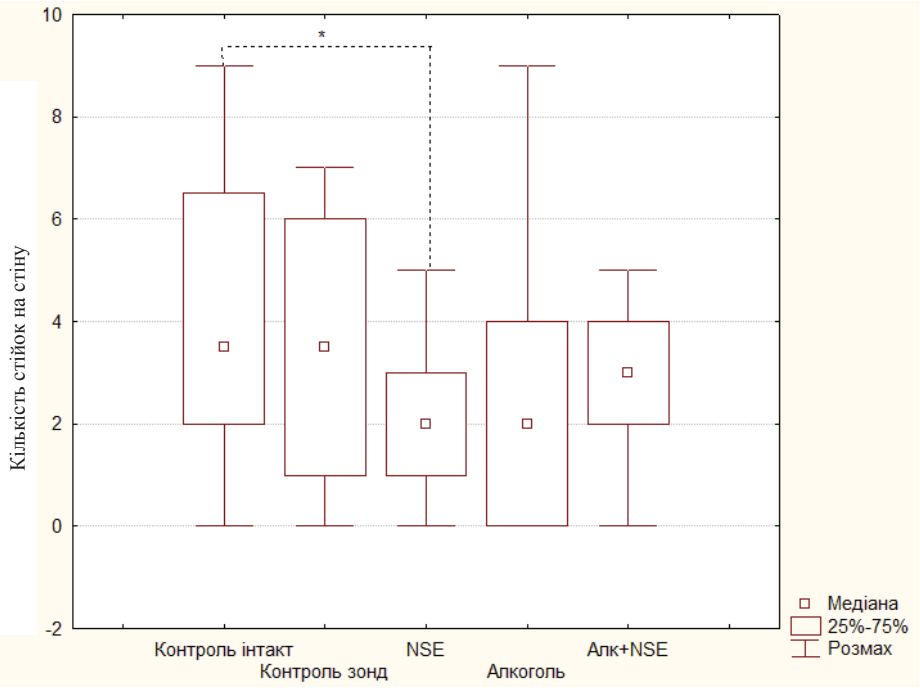

Рис. 2. Вертикальна активність тварин (кількість стійок на стіну) під час тестування у ВП.

Наші дослідження показали, що при повторному тестуванні кількість стійок на задні лапи (рис. 3) у тварин усіх груп була приблизно однаковою. Однак у тварин III групи кількість стійок на задні лапи була достовірно нижчою, ніж при першому тестуванні ($p<0,05$).

Аналіз грумінгової активності тварин різних груп показав, що кількість реакцій грумінгу при повторному тестуванні достовірно знижується у всіх групах, порівняно з першим тестуванням. При цьому у тварин IV групи при повторному тестуванні спостерігається лише тенденція до зменшення кількості таких реакцій ($p=0,07$) порівняно з групою інтактного контролю (рис. 4).

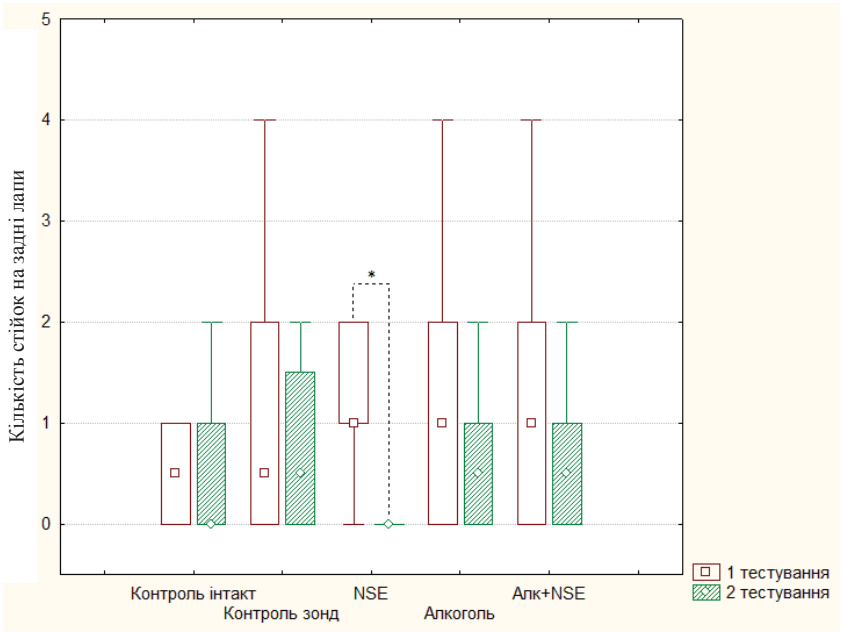

Рис. 3. Вертикальна активність тварин (стійки на задні лапи) під час тестування у ВП.

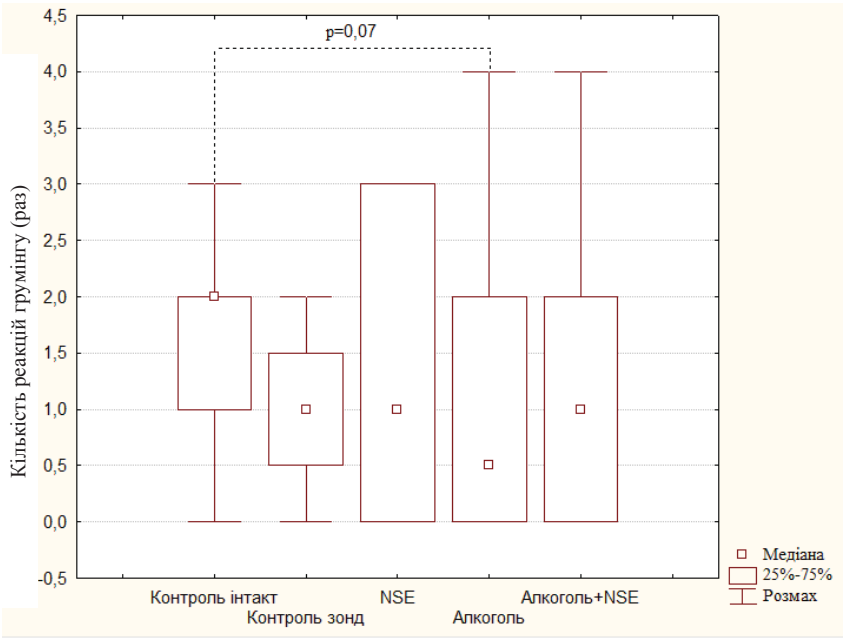

Рис. 4. Кількість реакцій грумінгу під час тестування у ВП.

Тривалість реакцій грумінгу у щурів I, II, IV та V групи була статистично нижчою, ніж у щурів цих груп при першому тестуванні ($p<0,05$). У щурів, які вживали тільки NSE, цей показник мав лише тенденцію до зменшення ($p=0,07$). Міжгрупової різниці за цим показником ми не виявили (рис. 5).

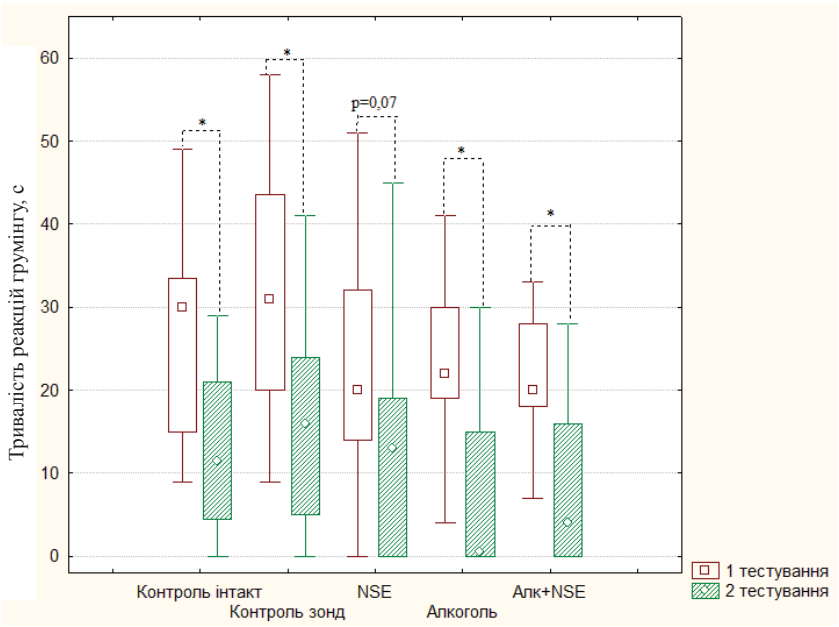

Рис. 5. Тривалість реакцій грумінгу під час тестування у ВП.

В експерименті з примусовою алкоголізацією реєстрація середньодобового об'єму вживання етанолу дала змогу виявити, що до початку 30-денної алкоголізації більше споживали етанол щури V групи, але ці відмінності виявилися недостовірними. Після завершення алкоголізації споживання спирту у щурів IV групи дещо збільшується, проте таке збільшення теж не є достовірним. У V групі оцінювання схильності щурів до етанолу після завершення 30-денної алкоголізації показало виражену тенденцію до зменшення рівня вживання етанолу (p=0,07) (рис. 6).

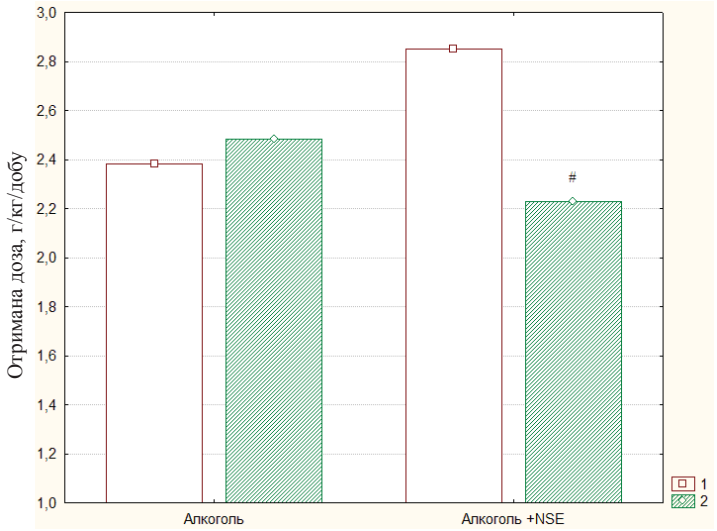

Рис. 6. Середньодобові показники вживання 15% етанолу щурами (отримана доза г/кг/добу): «1» – до 30-денної алкоголізації; «2» – після 30-денної алкоголізації (# – тенденція до зниження в «2» порівняно з «1» в V групі (p=0,07)).

Підсумовуючи результати проведених досліджень загалом можна стверджувати, що введення алкоголю, NSE та їхнього поєднання здатні змінювати поведінку щурів у ВП. Важливо при цьому наголосити, що такі зміни не є закономірні та лінійні. Іншими словами, ефекти досліджених нами речовин не завжди складаються і не завжди потенціюють або послаблюють дію одна одної. Хоча більшість ефектів, виявлених нами, є цілком закономірними. Так при повторній реєстрації локомоторної активності тварин спостерігається її зниження у тварин трьох експериментальних груп порівняно з першим тестуванням, чого ми не спостерігали у тварин контрольних груп. Подібний загальний спад активності у всіх п'яти груп щурів виявляється при повторній оцінці вертикальної рухової активності (стійок на стіну), кількості й тривалості грумінгу. Ми вважаємо, що це пов'язано не стільки зі специфічною дією фармакоагентів, скільки із повтором самої процедури тестування у ВП. Одним із проявів зменшення страху є дослідження щурами внутрішніх квадратів, котре поступово стає більш інтенсивним від досліду до досліду [2, 8]. Однак у даному експерименті нами не виявлено статистично значущої різниці між групами за кількістю відвідання тваринами внутрішніх квадратів, але факт незначного збільшення даного показника в контрольних групах щурів і зниження у всіх трьох експериментальних груп, вказує на посилення тривожно-фобічних реакцій у щурів після введення екзогенних речовин.

Зменшення кількості стійок у щурів III групи не тільки на бокову стінку установки, а й на задні лапи, без сумніву, є наслідком збільшення емоційного напруження у цих щурів і тривожності. Хоча що стосується збільшення часу та кількості актів грумінгу, статистичної різниці у цієї групи щурів не виявлено, тобто спостерігається дещо більша кількість грумінгів після вживання NSE. Посилення грумінгу відбувається у гризунів при розміщенні у нову чи стресогенну ситуацію, в цьому випадку інтенсивний грумінг є прикладом так званої «зміщеної активності», котра виникає у щурів при високому емоційному напруженні [7]. Ефекти, описані багатьма дослідниками, які виникають у тварин після вживання ендоканабіноїдів, узгоджуються з даними цього дослідження. Описані в багатьох джерелах ефекти для ендогенного канабіноїду анандаміду – такі як каталепсія (завмирання) та зменшення рухливості – знайдені і для стеароїлетаноламіну [10]. Зменшення кількості грумінгу у щурів IV групи може, навпаки, свідчити про зменшення емоційного напруження і тривожності. Нами не виявлено жодних статистично значущих відмінностей у тесті ВП між тваринами I та II групи, що беззаперечно свідчить про відсутність впливу процедури введення рідини через зонд на поведінкові реакції щурів.

Що стосується оцінки індивідуального об'єму спожитої рідини, то однозначно описати виявлені ефекти складно, адже моделювання такого багатофакторного захворювання, як алкоголізм, в експерименті на тваринах становить значну проблему. У людини при цій патології першочерговий вплив мають соціальні фактори, які важко відтворити в експериментах на щурах [1]. З іншого боку, біологічна основа хронічної дії алкоголю на організм людини і тварин в основному ідентична і може бути основою моделювання на тваринах [1]. Вагомий внесок у формування залежності має вроджена генетична схильність. Серед популяції білих нелінійних щурів виділяють тварин, які не вживають алкоголь, – 52%, тварин із помірною схильністю (вживання рівної кількості води та 15% розчину етанолу) – 25%, з вираженою схильністю до алкоголю – 23% [1]. Виявлене нами менш виражене вживання етанолу у щурів IV групи може бути пов'язане і з тим, що в цю групу потрапили щури, які не мають вродженої схильності до вживання етанолу. Тому навіть після хронічної алкоголізації рівень споживання етанолу в них може не зростати. Навпаки, у V групу, на нашу думку, могли увійти щури з більшою мотивацією до вживання алкоголю. Наявність тенден-

ції до зниження в цій групі індивідуального добровільного рівня спожитого етанолу після 30-денної алкоголізації є досить цікавим і потребує подальшого дослідження, адже, згідно з даними літератури, ендогенні канабіноїди здатні підвищувати схильність до вживання алкоголю [9]. Хоча існують дані і про те, що NSE зменшує рівень споживання морфіну [4]. Для з'ясування механізмів, які лежать в основі даного явища, необхідні більш детальні дослідження.

Загалом проведене дослідження показало, що NSE здатний пригнічувати локомоторну активність щурів у тесті ВП, не впливаючи на емоційну активність при повторних тестуваннях. Вживання NSE в останні 7 днів хронічної алкоголізації викликало появу стійкої тенденції до зниження мотивації щодо споживання етанолу щурами. Крім того, важливо підкреслити, що застосування NSE навіть у дозі 5 мг/кг може бути використане для подальшого вивчення його дії на когнітивно-мнестичні реакції у щурів.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. *Анохина И. П.* Генетика алкоголизма и наркоманий // Руководство по наркологии. 2002. Т. 1. С. 140–160.
2. *Буреш Я., Бурешова О., Хьюстон Д. П.* Методики и основные эксперименты по изучению мозга и поведения. М.: Медицина, 1991. С. 45–68.
3. *Горідько Т. М., Гула Н. М., Стогній Н. А.* та ін. Вплив N-стеароїлетаноламіну на процеси пероксидного окислення ліпідів та ліпідний склад печінки щурів при гострій морфінній інтоксикації // Укр. біохім. журнал. 2007. Т. 79. № 5. С. 175–185.
4. *Гула Н. М., Маргітич В. М., Артамонов М. В.* та ін. Нейропротекторний ефект N-ацетилетаноламінів за хронічної морфінної залежності. І. Фосфоліпіди головного мозку щурів як мішень для їхньої дії // Укр. біохім. журнал. 2004. Т. 76. № 5. С. 123–131.
5. *Гула Н. М., Маргітич В. М.* Жирні кислоти та їх похідні при патологічних станах. К.: Наук. думка, 2009. 346 с.
6. *Пархоменко Ю. М., Донченко Г. В., Пилипчук С. Ю.* Характерные метаболические нарушения в тканях крыс, вызванные длительным приемом алкоголя // Укр. біохім. журнал. 2007. Т. 79. № 3. С. 62–68.
7. *Balthazart J., Pröve E., Gilles R.* Hormones and Behaviour in Higher Vertebrates. B. Springer-Verlag. 1983. P. 118-136.
8. *Bogdanov V. B., Bogdanova O. V., Koulchitsky S. V.* et al. Behavior in the open field predicts the number of KCl-induced cortical spreading depressions in rats // Behav. Brain. Res. 2013. Vol. 236. N 1. P. 90–93.
9. *Hungund B. L., Basavarajappa B. S.* Are anandamide and cannabinoid receptors involved in ethanol tolerance? A review of the evidence // Alcohol&Alc. 2000 Vol. 35. N 2. P. 126–133.
10. *Maccarrone M., Cartoni A., Parolaro D.* et al. Cannabimimetic activity, binding, and degradation of stearoylethanolamide within the mouse central nervous system // Mol. Cell Neurosci. 2002. Vol. 21 N 1 P. 126–140.
11. *Moise A. M., Eisenstein S. A., Astarita G.* et al. An endocannabinoid signaling system modulates anxiety-like behavior in male Syrian hamsters // Psychopharmacology (Berl). 2008. Vol. 200. N 3. P. 333–346.
12. *Zanettini C., Panlilio L. V., Alicki M.* et al. Effects of endocannabinoid system modulationon cognitive and emotional behavior // Front. Behav. Neurosci. 2011. Vol. 5. N 57. P. 1–21.

Стаття: надійшла до редакції 01.03.13
доопрацьована 05.06.13
прийнята до друку 06.06.13

EFFECTS OF N-STEAROYLETHANOLAMINE AND CHRONIC ALCOHOLIZATION ON BEHAVIOR OF RATS IN "OPEN-FIELD"

O. Bondarenko[1], N. Gulaya[2], M. Makarchuk[1], T. Goridko[2], V. Baban[1], O. Kovalenko[1]

[1]Taras Shevchenko National University of Kyiv,
Educational and Scientific Centre «Institute of Biology»
2, Academician Glushkov Ave., Kyiv 03022, Ukraine
[2]Palladin Institute of Biochemistry, NAS of Ukraine (NASU)
9, Leontovych St., Kyiv 01601, Ukraine
e-mail: bondarenko__oleksandr@ukr.net

The behavioral reactions of rats after administration of alcohol and N-stearoylethanolamine (NSE) were investigated using "open field" test. It was observed that alcohol, NSE or both was able to change the behavior of rats in the open field. It was found that administration of NSE in the dose of 5 mg/kg during 7 days leaded to reduction of vertical and locomotor activity and had no effect on the parameters of the emotional activity (duration of grooming). Administration of the NSE during the last 7 day of 30-days chronic alcoholization resulted in slight reduction of the rat's motivation of the alcohol consumption in the case of free choice. At the same time, significant differences of behavior in «Alcohol» and «Alcohol and NSE» groups in open field weren't found.

Keywords: N-stearoylethanolamine, "open field" test, behavior, alcohol, dependence.

ВЛИЯНИЕ N-СТЕАРОИЛЭТАНОЛАМИНА И ХРОНИЧЕСКОЙ АЛКОГОЛИЗАЦИИ НА ПОВЕДЕНИЕ КРЫС В ТЕСТЕ ОТКРЫТОЕ ПОЛЕ

А. Бондаренко[1], Н. Гула[2], Н. Макарчук[1], Т. Горидько[2], В. Бабан[1], О. Коваленко[1]

[1]Киевский национальный университет имени Тараса Шевченко,
УНЦ «Институт биологии»
просп. Акад. Глушкова, 2, корп.12, Киев 03022, Украина
[2]Институт биохимии имени О.В. Палладина НАНУ
ул. Леонтовича, 9, Киев 01601, Украина
e-mail: bondarenko__oleksandr@ukr.net

Исследовали поведение крыс в тесте «открытое поле» после алкоголизации и введение N-стеароилэтаноламина (NSE). Обнаружено, что алкоголь, NSE и их сочетание способны изменять поведение крыс в открытом поле. Выяснено, что введение NSE в дозе 5 мг/кг в течение 7 дней подавляет локомоторную и вертикальную активность крыс и не влияет на показатели эмоциональной активности (продолжительности груминга). Введение NSE в последние 7 дней хронической 30-дневной алкоголизации несколько снижает мотивацию к потреблению этанола крысами в условиях свободного выбора, но при этом не выявлено существенных различий в поведении в открытом поле алкоголизированных животных и животных, которые на фоне алкоголя получали NSE.

Ключевые слова: N-стеароилэтаноламин, тест «открытое поле», поведение, алкоголь, зависимость.