

УДК 547.015+615.212.7.01

СОСТОЯНИЕ ОБМЕНА γ -АМИНОМАСЛЯНОЙ КИСЛОТЫ (ГАМК) В ГОЛОВНОМ МОЗГЕ КРЫС В ДИНАМИКЕ МОРФИНОВОГО АБСТИНЕНТНОГО СИНДРОМА

А.Г. Виницкая, В.В. Лелевич, С.В. Лелевич,
Е.М. Дорошенко

УО «Гродненский государственный медицинский университет»

В работе изучены активности ГАМК-катаболизирующих ферментов, уровни ГАМК и нейроактивных аминокислот в коре больших полушарий и мозжечке головного мозга крыс при моделировании морфинового абстинентного синдрома. Состояние отмены морфина вызывали путем прекращения внутрибрюшинного введения морфина сроками на 1 час, 36 часов, 3 и 7 суток после предварительной 7-дневной морфиновой нагрузки. Наблюдаемые изменения параметров обмена ГАМК и содержания нейроактивных аминокислот различались в зависимости от изучаемого отдела мозга и срока отмены введения морфина. Выдвинуто предположение об опосредованной адаптации ГАМК-ергических нейронов в отделах мозга с различной концентрацией опиатных рецепторов на длительное введение наркотика.

Ключевые слова: γ -аминомасляная кислота (ГАМК), ГАМК-шунт, сукцинатдегидрогеназа, аминокислоты, морфиновый абстинентный синдром (МАС), головной мозг.

The activities of the GABA catabolising enzymes, GABA and neuroactive amino acid levels were studied in rat cortex and cerebellum under experimental morphine withdrawal. MW was developed by means of the cessation of morphine interperitoneal injections for 1 and 36 hours, for 3 and 7 days after preliminary 7 days' morphine administration. The changes observed in the GABA metabolism and the amino acids levels differed in the brain regions tested and depended upon the duration of MW. The possible explanation of the shifts observed is likely to be associated with indirect adaptation of the GABAergic neurons in the brain regions differing in the opioid receptors contents to protracted morphine administration.

Key word: morphine withdrawal (MW), GABA shunt, succinate dehydrogenase, amino acids, brain

Известно, что в формировании опиатной наркомании значительную роль играют нарушения взаимодействия нейромедиаторных систем. Это касается практически всех изученных к настоящему времени нейротрансмиттеров: дофамина, норадреналина, серотонина, глутаминовой кислоты, γ -аминомасляной кислоты (ГАМК) и т.д. [2, 6, 7, 8]. Считается, что в нейрональных механизмах формирования пристрастия и физической зависимости от опиатов участвуют отдельные области головного мозга: гипоталамус, мезолимбическая дофаминовая система, кубовидное ядро, голубоватое место [8]. Определенную роль играют нарушения в функционировании тормозной ГАМК-ергической системы ЦНС. Между системой ГАМК и опиатными рецепторами имеется взаимодействие: в ряде регионов головного мозга μ -опиатные рецепторы, агонистом которых является морфин, локализованы на пресинаптических мембранах ГАМК-ергических нейронов [8]. Помимо дофамина и ГАМК, доказано участие глутамат- и глицинергических синапсов в формировании зависимости от опиатных наркотиков [7,8]. При систематическом введении морфина крысам в ЦНС формируется устойчивый дефицит тормозных нейромедиаторов, что приводит к появлению призна-

ков синдрома отмены наркотика и признаков гипервозбудимости ЦНС [7, 8]. Было доказано, что некоторые аминокислоты (аланин, аспарагин, глутамин) выполняют в ЦНС важную трофическую роль, являясь предшественниками нейромедиаторов или поставщиками субстратов в цикл трикарбоновых кислот [10-13]. Причем, около 17% от всей активности ЦТК в целом мозге приходится на анаплеротический путь превращения ГАМК в субстраты ЦТК [10, 13].

Исходя из вышеизложенного, целью данного исследования явилось изучение состояния катаболизма ГАМК, некоторых реакций ЦТК и содержания нейроактивных аминокислот в отделах головного мозга крыс в динамике синдрома отмены морфина.

Материалы и методы исследования

Эксперименты были выполнены на 36 белых беспородных крысах самцах массой 180-200 г. Животные были разделены на 5 групп по 7-8 особей в каждой из них. Контрольным животным вводили эквивалентные количества 0,9% раствора хлорида натрия. Хроническую морфиновую интоксикацию в подопытных группах вызывали путем внутрибрюшинного введения 1% раствора морфина гидрохлорида в течение 7 суток, дважды в сут-

ки, используя общепринятые методики [3]. Применяли следующий протокол введения: 1-2 сутки морфин вводили внутривенно в суточной дозе 10 мг/кг массы тела; 3-4 сутки – в суточной дозе 20 мг/кг; 5-7 сутки – в суточной дозе 40 мг/кг. При моделировании морфинового абстинентного синдрома (МАС) мы использовали модель спонтанного, «натурального» абстинентного синдрома путем прекращения назначения наркотика [2, 15]. Декапитацию крыс проводили через 1 час, через 36 часов, 3 суток и 7 суток после последней инъекции морфина.

Крыс декапитировали, головной мозг делили на отделы. Выделяли кору больших полушарий и мозжечок, которые немедленно замораживали в жидком азоте. В гомогенатах отделов мозга определяли активность ферментов катаболизма ГАМК: ГАМК-трансаминазы (ГАМК-Т) и дегидрогеназы янтарного полуальдегида (ЯПА-ДГ) [9], сукцинатдегидрогеназы (СДГ) [4]. Белок определяли по Лоури. Параллельно в хлорных экстрактах структур мозга определяли содержание нейроактивных аминокислот (ГАМК, глутамат, аланин, аспарат, аспарагин) методом ВЭЖХ [1]. Содержание аминокислот выражали в нмоль на грамм ткани, а активности ферментов – в нмоль/мг белка в минуту. Достоверность различий между группами оценивали параметрическим методом с применением т критерия Стьюдента.

Результаты и обсуждение

Внутрибрюшинное введение крысам инъекций морфина в течение 7 суток приводит к формированию у них синдрома физической зависимости. После этого прекращение введения наркотика вызывает появление так называемого «натурального» абстинентного синдрома, который выражается в усилении агрессивности животных и появлении других признаков гипервозбудимости ЦНС [3, 7]. Степень адаптационных сдвигов, вызываемых длительным введением морфина и его отменой, оценивали по изменению параметров метаболизма ГАМК и содержанию нейроактивных аминокислот.

В коре больших полушарий через 1 час после последней инъекции морфина не наблюдали статистически достоверных изменений в содержании исследуемых аминокислот, за исключением тенденции к снижению уровня ГАМК (рис. 1). Активность ГАМК-Т не изменилась достоверно по отношению к контролю, а активность ЯПА-ДГ повысилась на 17,6% ($p < 0,05$). Увеличение срока отмены до 36 часов вызвало значительное повышение содержания глутамина (на 154,3%; $p < 0,001$) на фоне тенденции к снижению уровня ГАМК (рис. 1). Одновременно в этом отделе мозга выросла активность ГАМК-Т на 76,9% ($p < 0,01$). Через 3 суток отмены значительно увеличились уровни

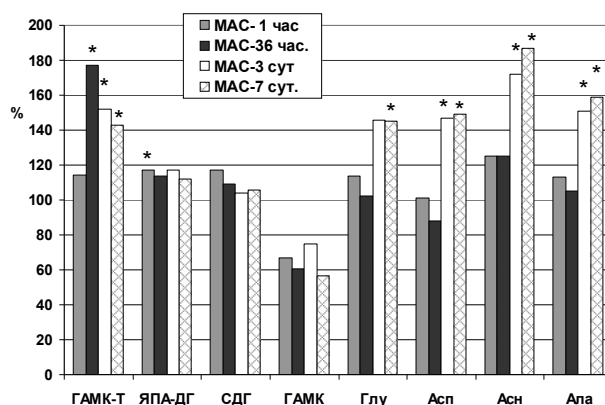


Рис. 1. Активность ферментов обмена ГАМК и сукцинатдегидрогеназы (СДГ), содержание нейроактивных аминокислот в коре больших полушарий мозга крыс в динамике морфинового абстинентного синдрома (МАС). (в % к контролю, * $p < 0,05$ по сравнению с контролем)

аминокислот, выполняющих в ЦНС запасующую функцию, то есть аспарагина и аланина [10, 12] на 71,9% и 51,4%, соответственно. Одновременно проявилась тенденция к накоплению нейромедиаторов возбуждения аспартата и глутамата на фоне тенденции к снижению концентрации ГАМК. Аналогично, как в группе МАС-1 час отмечена активация ГАМК-Т. Увеличение срока отмены до 7 суток привело в коре больших полушарий к повышению уровней аспарагина и аланина на 86,7% и 58,9% ($p < 0,05$), соответственно. Увеличилось содержание глутамата на 44,9% ($p < 0,05$) на фоне тенденции к уменьшению уровня ГАМК и активации ГАМК-Т на 43,2% ($p < 0,05$) (рис. 1).

Изменения исследуемых показателей в мозжечке носили несколько иной характер (рис. 2). Через 1 час после отмены морфина были отмечены тенденции к уменьшению содержания глутамата, аспартата, аспарагина и аланина. Одновременно не изменились активности ферментов ГАМК-шунта,

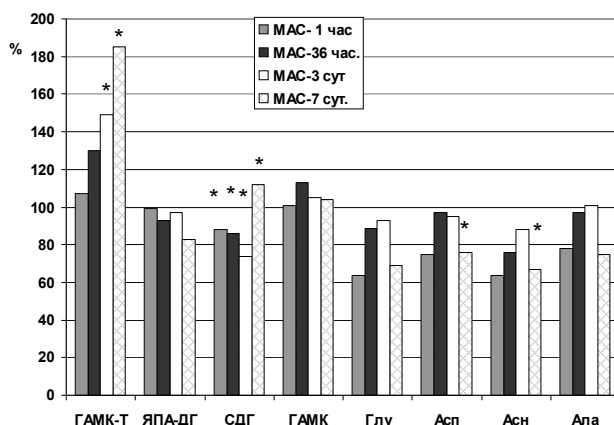


Рис. 2. Активность ферментов обмена ГАМК и сукцинатдегидрогеназы (СДГ), содержание нейроактивных аминокислот в мозжечке мозга крыс в динамике морфинового абстинентного синдрома (МАС). (в % к контролю, * $p < 0,05$ по сравнению с контролем)

и снизилась активность СДГ на 21,9% ($p < 0,05$). Через 36 часов после отмены наркотика в этом отделе мозга отмечено снижение активности СДГ. Через 3 суток МАС повысилась активность ГАМК-Т на 49,9% ($p < 0,05$) и снизилась – СДГ на 26,3% ($p < 0,05$). На 7 сутки МАС в мозжечке произошло снижение уровня аспарагина на 32,4% ($p < 0,05$) на фоне активации ГАМК-Т (на 85,4%; $p < 0,05$) и СДГ (на 11,6%; $p < 0,05$) (рис. 2).

Следовательно, в исследуемых отделах мозга крыс были выявлены различные по направленности изменения уровней аминокислот и метаболизма ГАМК, вызванные отменой введения морфина после хронической морфиновой интоксикации. Наиболее вероятным объяснением этого факта является присутствие в этих отделах ЦНС различных концентраций ГАМК- и глутаматергических нейронов, в которых сосредоточена наибольшая часть ферментов метаболизма ГАМК и исследуемых аминокислот [12]. По данным литературы, опиатные рецепторы неравномерно распределены по отделам головного мозга и локализованы на поверхности пре- или постсинаптических мембран ГАМК-ергических, глутаматергических и других нейронов [2,11]. Радиоиммунными методами наибольшая плотность опиатных рецепторов была обнаружена в коре больших полушарий, таламусе, стволовых структурах, тогда как они почти отсутствовали в мозжечке головного мозга млекопитающих [11].

Проведенные исследования показали, что в коре больших полушарий через 1 час после последней инъекции морфина происходит некоторое накопление глутамина и аспарагина. Тенденция к снижению уровня ГАМК на фоне активации ГАМК-Т, возможно, указывает на снижение активности тормозных ГАМК-ергических нейронов в корковых структурах, вызванное длительным введением морфина. Увеличение длительности отмены морфина способствовало усилению обозначенных тенденций в коре больших полушарий, поскольку через 3 и 7 суток отмены наиболее значительно увеличиваются уровни глутамина и аспарагина при одновременном росте концентраций их предшественников – глутамата и аспартата (рис. 1). По данным литературы, в коре больших полушарий обнаружена большая концентрация нейромедиаторов возбуждения глутамата и аспартата, а также высокая плотность АМДА- и NMDA- рецепторов [8]. Увеличение концентрации глутамата и уменьшение ГАМК может свидетельствовать об усилении процессов возбуждения над торможением в этом отделе мозга при отмене морфина. Кроме того, глутамат в высоких концентрациях обладает нейротоксичностью, как и накопление свободных ионов аммония [12]. По другим данным, аланин

выполняет в ЦНС важную функцию переноса аминокрупп между глией и нейронами, а также используется как источник пирувата [13]. Таким образом, значительное увеличение уровней глутамина и аспарагина в коре больших полушарий в дальние сроки отмены может указывать на включение защитного механизма, ведущего к нейтрализации токсичного аммония и направленного на уменьшение концентрации глутамата. Повышение концентрации аланина в этом отделе мозга в дальние сроки отмены морфина, возможно, свидетельствует об увеличении синтеза образования соединений с запасающей функцией на фоне прекращения поступления наркотика.

В отличие от коры больших полушарий, в мозжечке практически отсутствуют опиатные рецепторы [2], но имеется большое количество ГАМК-ергических вставочных нейронов и ферментов обмена нейромедиатора [11,12]. Особенности строения мозжечка, по-видимому, обусловили иную направленность сдвигов изученных показателей в динамике МАС. Здесь, по мере увеличения срока отмены, проявилась тенденция к уменьшению уровней глутамина, аспарагина, глутамата и аспартата (рис. 2). В этом отделе мозга уменьшение концентраций нейромедиаторов возбуждения – глутамата и аспартата, может указывать на усиление процессов торможения в мозжечке, в отличие от его активации в коре больших полушарий при отмене морфина. Это может свидетельствовать о различной роли этих отделов головного мозга в генерации симптомов абстинентного синдрома. Одновременно в мозжечке крыс на фоне отмены морфина повышение активности ГАМК-Т сопровождается угнетением СДГ, что может быть связано с недостаточной компенсацией угнетения активности ЦТК при отмене морфина.

Как известно, морфин, являясь агонистом опиатных рецепторов, способен модулировать активность аденилатциклазной системы, активация которой происходит при формировании синдрома зависимости от морфина [1, 5, 6]. Ранее была показана связь между функциональной активностью аденилатциклазной системы и реакциями ЦТК, поскольку на внутренней митохондриальной мембране нервных клеток были обнаружены рецепторы для цАМФ [6]. Следовательно, выявленные изменения внутримитохондриальных реакций – ЦТК и катаболизма ГАМК, могут быть вызваны модулированием морфином аденилатциклазной системы. Согласно гипотезе, выдвинутой в 80-е годы Розановым В.А. [5], в головном мозге млекопитающих активация метаболизма ГАМК используется для превращения ГАМК и глутамата в субстраты ЦТК, дефицит которых развивается при некоторых видах интоксикаций.

Таким образом, изменения активности ферментов метаболизма ГАМК в коре больших полушарий и мозжечке в динамике МАС могут быть обусловлены реакцией нейронов этих отделов мозга на прекращение инъекций морфина на фоне хронической морфиновой интоксикации. Изменения в концентрациях ГАМК и метаболически близких ей аминокислот, вероятно, являются следствием различной модуляции морфином ферментов обмена этих аминокислот в этих отделах мозга, в которых постулируется неравномерное распределение опиатных рецепторов и их необязательное сопряжение с ГАМК-ергическими нейронами [2, 11]. В мозжечке, в котором отсутствуют опиатные рецепторы, также были отмечены изменения в значениях изученных показателей. Можно предположить, что сдвиги в активности ферментов ГАМК-шунта и ЦТК, и содержании аминокислот были обусловлены другими причинами, не связанными с непосредственной модуляцией морфином ГАМК-ергических нейронов.

Литература

1. Влияние однократного введения морфина гидрохлорида на функциональную активность ЦТК и ГАМК-шунта, содержание нейроактивных аминокислот в головном мозге крыс / В.В. Лелевич, Х. Абазид, А.Г. Виницкая, Е.М. Дорошенко // *Нейрохимия*. – 2005. – Т., № 1. – С. 38-43.
2. Булаев В.М. Рецепторы опиатов и их лиганды. – Итоги науки и техники. Фармакология. Химиотерапевтические средства. – Москва, 1982. – Т. 13. – С. 101-184.
3. Оценка индивидуальной чувствительности крыс линии Вистар к формированию зависимости от морфина / М.А. Константинопольский, Л.А. Суркова, И.В. Тюрина, С.К. Судаков // *Экспериментальная и клиническая фармакология*. – 1992. – Т. 55, № 2. – С. 9-11.
4. Прохорова, М.И. Методы биохимических исследований / М.И. Прохорова. – Л.: Изд-во ЛГУ. 1982. – С. 188-226.
5. Розанов В.А. Метаболическая роль ГАМК-шунта в центральной нервной системе при экстремальном состоянии // *Успехи современной биологии*. – 1989. – Т. 103, № 3. – С. 375-391.
6. Роль внутренней мембраны в реализации цАМФ-зависимой активации митохондриальных ферментов / А.Е. Медведев, Л.В. Труфанова, А.В. Голубенко, В.И. Кулинский // *Биохимия*. – 1990. – Т. 55, № 2. – С. 225-231.
7. Участие нейромедиаторных систем в развитии абстинентного синдрома при опиатной наркомании / А.И. Головкин, С.М. Тихомиров, С.И. Головкин, Л.Л. Леонтьева, и соавт. // *Нейрохимия*. – 2003. – Т. 20, № 4. – С. 245-258.

8. Cami, J. Drug addiction / J. Cami, M. Farre // *The New Eng. J. of Medicine*. – 2003. – Vol. 349, N 10. – P. 975-986.
9. De Boer Th., Bruinvels J. Assay and properties of 4-aminobutyric-2-oxoglutaric acid transaminase and succinic semialdehyde dehydrogenase in rat brain tissue // *J. Neurochem.* -1977. – Vol. 28. – P. 471-478.
10. Hassel B., Johannessen C.U., Sonnewald U., Fonnum F. Quantification of the GABA shunt on the importance of the GABA shunt versus the 2-oxoglutarate dehydrogenase pathway in the GABA-ergic neurons // *J. Neurochem.* – 1998. – Vol. 71. – P. 1511-1518.
11. Kruk Z.L., Pycock C.J. Neurotransmitters and drugs. – Croom Helm, London & Canberra., 1983. – P. 147-155.
12. Patel, A.J. Metabolic compartmentation of glutamate associated with the formation of g-aminobutyrate / A.J. Patel, A.L. Johnson, R. Balazs // *J. Neurochem.* – 1974. – Vol. 23. – P. 1271-1279.
13. Sonnewald U., McKenna M. Metabolic compartmentation in cortical synaptosomes: influence of glucose and preferential incorporation of endogenous glutamate in to GABA // *Neurochem. Res.* – 2002. – Vol. 27, № 1-2. – P. 43-50.

Resume

GABA METABOLISM AND NEUROACTIVE AMINO ACIDS IN RAT BRAIN UNDER MORPHINE WITHDRAWAL SYNDROME

A.G. Vinitskaya, V.V. Lelevich, S.V. Lelevich,
Ye.M. Doroshenko

Grodno State Medical University

In the article the changes in GABA metabolism and the neuroactive amino acid contents in rat brain regions were studied under experimental morphine withdrawal. MW was developed by means of the cessation of morphine interperitoneal injections for 1 and 36 hours, for 3 and 7 days after preliminary 7 days' morphine administration. In cortex the reliable increase in the contents of glutamate, asparagine, and alanine was observed in remote terms of MW. In cerebellum MW led to decrease in the levels of asparagine, followed by the GABA-transaminase activation and the succinate dehydrogenase inhibition. The shifts observed in the amino acids levels and the GABA shunt activity are likely to be explained by indirect adaptation of the brain regions differing in the opioid receptors contents to protracted morphine administration.

Поступила 31.01.07