

УДК 547.015+615.212.7.015.156.015.4

## ВЛИЯНИЕ ДЛИТЕЛЬНОЙ МОРФИНОВОЙ НАГРУЗКИ НА ОБМЕН ГАМК И РЕАКЦИИ ЦИКЛА ТРИКАРБОНОВЫХ КИСЛОТ В БОЛЬШИХ ПОЛУШАРИЯХ МОЗГА КРЫС

Хусам Абазид

УО «Гродненский государственный медицинский университет»



Хусам Абазид – аспирант кафедры биологической химии.  
E-mail: h.pharm@mail.ru

Исследовали влияние хронической морфиновой интоксикации в течение 7, 14, 21 суток на активность ферментов ГАМК-шунта (ГАМК-трансаминазы, ЯПА-дегидрогеназы) и цикла трикарбонных кислот (сукцинатдегидрогеназы, НАД<sup>+</sup>-изоцитратдегидрогеназы) в коре больших полушарий мозга крыс. Наблюдали зависимость от длительности интоксикации активацию НАД<sup>+</sup>-ИДГ и разнонаправленные сдвиги в активности ГАМК-Т и ЯПА-ДГ. Предполагается, что полученные результаты исследования отражают защитный механизм адаптации нейронов коры больших полушарий к длительной морфиновой нагрузке.

**Ключевые слова:** хроническая морфиновая интоксикация (ХМИ),  $\gamma$ -аминомасляная кислота (ГАМК), ГАМК-трансаминаза (ГАМК-Т), ЯПА-дегидрогеназа (ЯПА-ДГ), сукцинатдегидрогеназа (СДГ), НАД<sup>+</sup>-изоцитратдегидрогеназа (НАД<sup>+</sup>-ИДГ), кора больших полушарий.

*The influence of chronic morphine administration during the 7th, 14th and 21st day on the activity of the GABA-shunt enzymes (GABA-transaminase and SSA-dehydrogenase) and the TCA cycle (succinate dehydrogenase, NAD<sup>+</sup>-isocitrate dehydrogenase) in the cerebral cortex of rats was studied. We observed the NAD<sup>+</sup>-IDH activation dependence upon the duration of morphine exposure and the contradictory changes in the activity of GABA-T and SSA-DH. We suppose that the results obtained are likely to express a protective mechanism of the cortical neurons adaptation to chronic morphine intoxication.*

**Key words:** chronic morphine intoxication (ChMI),  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA), GABA-transaminase (GABA-T), SSA-dehydrogenase (SSA-DH), succinate dehydrogenase (SDH), NAD<sup>+</sup>-isocitrate dehydrogenase (NAD<sup>+</sup>-IDH), cerebral cortex.

Ведущую роль в формировании основных симптомов опийной наркомании играют нарушения нейромедиаторных систем ЦНС, опосредуемые изменениям со стороны опиатных рецепторов [5, 10, 13, 14, 15]. Наркотический анальгетик морфин является агонистом  $\mu$ -опиатных рецепторов, высокая плотность которых обнаружена во фронтальной коре, стволе, медиальной области таламуса и некоторых других отделах мозга [5, 12]. Известно, что местом локализации метаболитных  $m$ -опиатных рецепторов могут быть другие нейромедиаторные синапсы, в том числе и ГАМК-ергические. В вентральной области покрышки агонисты  $m$ -опиатных рецепторов вызывают гиперполяризацию и активацию дофаминергической проводимости за счет угнетения активности ГАМК-ергических интернейронов [9]. Полагают, что передача сигнала после связывания морфина с рецептором приводит к модуляции активности аденилатцикласной системы, запускающей каскад биохимических изменений внутри клетки [9, 15]. Интерес к изучению роли  $\gamma$ -аминомасляной кислоты (ГАМК) в генезе наркотических заболеваний объясняется также уникальной метаболической ролью этой

аминокислоты, обмен которой напрямую связан с циклом трикарбонных кислот (ЦТК). В головном мозге млекопитающих в среднем около 17%  $\alpha$ -кетоглутарата превращается в сукцинат посредством ферментов метаболизма ГАМК, формирующих так называемый ГАМК-шунт [8]. По последним данным, в корковых отделах ЦНС соотношение реакций ГАМК-шунта и ЦТК составляет 1:1, что определяется концентрацией ГАМК-ергических нейронов [16]. Существует мнение, что активация ГАМК-метаболизирующих ферментов может способствовать восполнению дефицита энергетических субстратов при некоторых патологических состояниях, сопровождаемых нарушениями энергетического обмена в нейронах (ишемия, гипоксия, интоксикация) [3].

Целью данного исследования явилось изучение воздействия хронической морфиновой интоксикации (ХМИ) различной длительности на активность ферментов катаболизма ГАМК и ключевых реакций ЦТК в больших полушариях мозга крыс.

### Материалы и методы

Эксперименты были выполнены на белых беспородных крысах-самцах массой 180-200 г. Живот-

ные были разделены на четыре группы по восемь особей в каждой из них. Контрольным животным вводили эквивалентные количества 0,9% раствора хлорида натрия (I группа). Назначение морфина проводили дважды в сутки по следующей схеме: 1-2 дня по 10 мг/кг/сутки, 3-4 дни – по 20 мг/кг/сутки. Начиная с 5 дня до конца эксперимента, суточная доза морфина была увеличена до 40 мг/кг массы тела. Сроки хронической морфиновой интоксикации (ХМИ) составили 7 суток (II группа), 14 суток (III группа) и 21 день (IV группа). Декапитацию крыс проводили через 1 час после последней инъекции морфина и физиологического раствора, извлекали головной мозг, быстро выделяли кору больших полушарий и другие отделы головного мозга и немедленно замораживали в жидком азоте.

В гомогенатах отделов мозга крыс определяли активность ферментов катаболизма ГАМК - ГАМК-трансаминазы (ГАМК-Т), дегидрогеназы янтарного полуальдегида (ЯПА-ДГ) [4], а также ферментов ЦТК - НАД<sup>+</sup>-зависимой изоцитратдегидрогеназы (НАД<sup>+</sup>-ИДГ) и сукцинатдегидрогеназы (СДГ) [2]. Содержание белка определяли по методу Лоури. Достоверность различий между группами оценивали параметрическим методом с применением t критерия Стьюдента.

### Результаты и обсуждение

Согласно литературным данным, внутрибрюшинное введение морфина крысам формирует физическую зависимость от наркотика на 7-14 суток интоксикации [1]. После этого прекращение введения наркотика может способствовать появлению у них некоторых признаков абстинентного синдрома, усиливаемых введением антагонистов опиатных рецепторов [1, 13]. Изменения показателей обмена ГАМК и ЦТК в коре больших полушарий при хронической морфиновой интоксикации показаны на рис. 1, 2.

7-дневное введение морфина (II группа) не оказало влияние на катаболизм ГАМК в исследуемом отделе мозга (рис. 1). В то же время активность сукцинатдегидрогеназы достоверно уменьшилось на 12,8% ( $p < 0,05$ ) без изменения активности ключевого фермента ЦТК – НАД<sup>+</sup>-зависимой изоцитратдегидрогеназы (рис. 2). Увеличение срока введения наркотика до 14 дней (III группа) привело к разнонаправленным сдвигам в активности ферментов катаболизма нейромедиатора: активность ГАМК-Т показала тенденцию к повышению, тогда как превращение янтарного полуальдегида ЯПА-ДГ снизилось на 14,5% по сравнению с контрольной группой (рис. 1). Одновременно в этой группе было отмечено значительное повышение активности НАД<sup>+</sup>-ИДГ на 82,9% ( $p < 0,01$ ) без изменения активности СДГ (рис. 2).

Введение морфина в течение 21 суток (IV группа) оказало наиболее выраженное воздействие на катаболизм ГАМК, тогда как активности ферментов ЦТК достоверно не изменились (рис. 1, 2). Направление изменений активностей ГАМК-Т и ЯПА-ДГ было идентично, по сравнению с III группой крыс, но значительно более усилено. Активность ЯПА-ДГ понизилась на 15,9% ( $p < 0.05$ ) на фоне трехкратного повышения активности ГАМК-Т ( $p < 0.0001$ ).

По литературным данным, катаболизм использованной ГАМК происходит больше в окружающих синапс глиальных клетках, и меньше – в постсинаптической клетке [8, 16]. При этом ГАМК-трансаминазная реакция является лимитирующей стадией этого процесса и протекает в несколько раз медленнее, чем стадия последующего окисления янтарного полуальдегида до янтарной кислоты [6]. В исследуемом отделе мозга 7-дневная нагрузка морфином вызывает только достоверное снижение активности СДГ и не меняет значимо величины других показателей. Однако увеличение нагрузки до 14 суток приводит к угнетению активности ЯПА-ДГ на фоне тенденции к активации ГАМК-Т. Вероятно, это свидетельствует о частичном превращении янтарного полуальдегида в

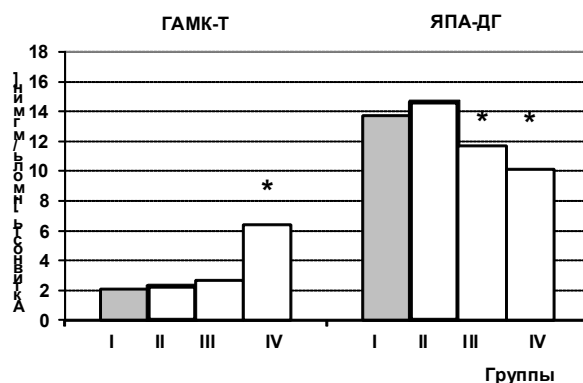


Рис. 1. Активность ферментов катаболизма ГАМК в больших полушариях мозга крыс при хронической морфиновой интоксикации (ХМИ).

Группы: I – контроль; II – 7 сут. ХМИ; III – 14 сут. ХМИ; IV – 21 сут. ХМИ.

\* - достоверные различия с контролем.

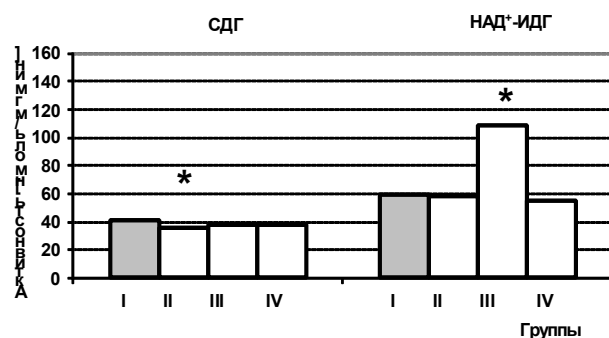


Рис. 2. Активность ферментов ЦТК в больших полушариях мозга крыс при хронической морфиновой интоксикации (ХМИ). Группы: I – контроль; II – 7 сут. ХМИ; III – 14 сут. ХМИ; IV – 21 сут. ХМИ.

\* - достоверные различия с контролем.

γ-оксималяную кислоту (ГОМК), которой отводится важная роль в адаптации организма к некоторым токсическим воздействиям [3]. Интересно, что такие изменения в III группе животных сопровождаются значительной активацией НАД<sup>+</sup>-ИДГ (рис. 2).

По данным литературы, НАД<sup>+</sup>-ИДГ относится к ключевым регуляторным ферментам ЦТК, и изменение ее активности свидетельствует о замедлении или ускорении оборота субстратов в цикле Кребса [11]. В нервной ткани роль митохондриальной НАД<sup>+</sup>-ИДГ заключается не только в регуляции скорости потока субстратов в ЦТК, но и продукции важного промежуточного соединения – α-кетоглутаровой кислоты с целью образования нейромедиаторных аминокислот – глутамата и ГАМК [11]. Следовательно, в коре больших полушарий животных с 14-дневной ХМИ могло возникнуть ускорение оборота субстратов в ЦТК, однако, не за счет компенсаторной активации ГАМК-катаболизирующих ферментов. Интересно, что исследование аналогичных показателей в этой модели ХМИ, показало более выраженную активацию ГАМК-Т и НАД<sup>+</sup>-ИДГ в стволе и таламической области, по-видимому, указывающее на компенсаторное усиление оборота субстратов в метаболизме ГАМК и ЦТК. Вероятно, в коре больших полушарий 14-дневная нагрузка морфином вызвала повышение активности цикла Кребса за счет других ресурсов, а не ГАМК-шунта.

Несколько иная картина в исследуемом отделе мозга была отмечена после 21-дневного введения наркотика. Здесь достоверно изменились только активности ГАМК-катаболизирующих ферментов. Высокий прирост янтарного полуальдегида, образованного при активации ГАМК-Т, возможно, привел к активации ЯПА-Р и образованию ГОМК. Накопление этого соединения, обладающего анксиолитическими свойствами, наблюдается при хронической алкогольной интоксикации [7], и, возможно, имеет важное значение при формировании «аллостаза» - совокупности патологических устойчивых метаболических изменений, сопровождаемых физической зависимостью от наркотических веществ [10]. Последние авторы считают, что основную роль в развитии «аллостатических» (отличных от гомеостатических) сдвигов в метаболизме нервной ткани играют цепь анатомических структур ЦНС, соединенных в так называемую кортико-стриально-таламическую петлю [10].

Таким образом, наблюдаемые сдвиги в активности ферментов ГАМК-шунта и ЦТК могли быть опосредованы реакцией m-опиатных рецепторов корковых отделов мозга на длительное введение

морфина. Эти сдвиги варьировали в группах животных с различной длительностью морфиновой нагрузки и были наиболее выражены в мозге животных после 14- и 21-дневной ХМИ. В частности, по мере увеличения срока морфинизации в коре больших полушарий регистрируется усиление тенденции к превращению янтарного полуальдегида в субстраты, отличные от сукцината, и уменьшение компенсаторного вклада ГАМК-шунта в биоэнергетику клетки. В заключение можно предположить, что полученные результаты представляют собой различные стадии гипотетической «аллостатической» адаптации нейронов коры больших полушарий к ХМИ. Более точное представление о предполагаемом механизме могли бы дать дальнейшие исследования с использованием других показателей ГАМК-ергической системы.

#### Литература

1. Константинопольский М.А., Суркова Л.А., Тюрина И.В., Судаков С.К. Оценка индивидуальной чувствительности крыс линии Вистар к формированию зависимости от морфина // Эксп. и клин. фармакология. - 1992. - Т. 55, № 2. - С. 9-11.
2. Прохорова М.И. Методы биохимических исследований. - Л.: Изд-во ЛГУ, 1982. - С. 188-226.
3. Розанов В.А. Метаболическая роль ГАМК-шунта в центральной нервной системе при экстремальном состоянии // Успехи соврем. биологии. - 1989. - Т. 103, № 3. - С. 375-391.
4. 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.
5. De Vries T.J., Shippeberg T.S. Neural systems underlying opiate addiction // J. Neurosci. - 2002. - May 1, Vol. 22, N 9. - P. 3321-3325.
6. Erecinska M., Nelson D., Daikhin Ye., Yudkoff M. Regulation of GABA level in rat brain synaptosomes: fluxes through enzymes of the GABA shunt and effects of glutamate, calcium, and ketone bodies // J. Neurochem. - 1996. - Vol. 67. - P. 2325-2334.
7. Fadda F., Rossetti Z.L. Chronic ethanol consumption: from neuroadaptation to neurodegeneration // Progress in Neurobiology. - 1998. - Vol. 56. - P. 385-431.
8. 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.
9. Johnson S.W., North R.A. Opioids excite dopamine neurons by hyperpolarization of local interneurons // J. Neurosci. - 1992. - Vol. 12. - P. 483-488.
10. Koob G.F., Le Moal M. Drug addiction, dysregulation of reward and allostasis // Neuropsychopharmacology. - 2001. - Vol. 24, N 2. - P. 97-129.
11. Kugler P., Vogel S. Microphotometric determination of enzymes in brain sections. IV. Isocitrate dehydrogenases // Histochemistry. - 1991. - Vol. 95, N 6. - P. 629-633.
12. Kruk Z.L., Pycocock C.J. Neurotransmitters and drugs. - Croom Helm, London & Canberra, 1983. - P. 147-155.
13. Lungford-Hughes A., Nutt D. Neurobiology of addiction and implications for treatment // Brit. J. Psychiatry. - 2003. - V. 182. - P. 97-100.
14. Van Ree J.M., Gerrits M.A.F.M., Vanderschuren L.J.M.J. Opioids, reward and addiction: an encounter of biology, psychology, and medicine // Pharmacol. Reviews. - 1999. Vol. 51. - N. 2. - P. 341-396.
15. Vetulani J. Drug addiction. Part II. Neurobiology of addiction // Pol. J. Pharmacol. - 2001. - Vol. 53. - P. 303-317.
16. Waagepetersen H.S., Sonnewald U., Larsson O.M., Schousboe A. Multiple compartments with different metabolic characteristics are involved in biosynthesis of intracellular and released glutamine and citrate in astrocytes // Glia. - 2001. - Sept. Vol. 35, - N 3. - P. 246-252.