

УДК 547.015+615.212.7.015.156.015.4

ОСОБЕННОСТИ ОБМЕНА γ -АМИНОМАСЛЯНОЙ КИСЛОТЫ И АКТИВНОСТЬ ЦИКЛА ТРИКАРБОНОВЫХ КИСЛОТ ПРИ ДЕЙСТВИИ МОРФИНА

Х. Абазид¹, А.Г. Виницкая¹, В.В. Лелевич^{1,2},¹Гродненский государственный медицинский университет²Институт биохимии НАН РБ, Гродно, Беларусь

Изучено влияние острой морфиновой интоксикации на активность ферментов катаболизма ГАМК (ГАМК-трансаминазы, ЯПА-дегидрогеназы) и цикла трикарбонных кислот (сукцинатдегидрогеназы, НАД⁺-изоцитратдегидрогеназы) в головном мозге крыс. В изученных отделах мозга введение морфина привело к дозозависимому угнетению активности НАД⁺-ИДГ и ГАМК-Т, что может указывать на общее замедление оборота субстратов в ЦТК и уменьшение компенсаторного вклада минорного ГАМК-шунта. Выдвинуто предположение, что наблюдаемые сдвиги в активности ферментов возникли адаптационно в ответ на действие морфина и слагаются из комплекса изменений на уровне ГАМК-ергических нейронов и окружающих их астроцитов.

Ключевые слова: морфин, γ -аминомасляная кислота (ГАМК), ГАМК-трансаминаза (ГАМК-Т), ЯПА-дегидрогеназа (ЯПА-ДГ), сукцинатдегидрогеназа (СДГ), НАД⁺-изоцитратдегидрогеназа (НАД⁺-ИДГ), головной мозг.

The influence of acute morphine intoxication on the activity of the GABA-catabolising enzymes (GABA-transaminase and SSA-dehydrogenase) and the TCA cycle (succinate dehydrogenase, NAD⁺-isocitrate dehydrogenase) enzymes in rat brain has been studied. In all brain regions tested morphine administration exerted a dose-dependent inhibition of the NAD⁺-IDH and GABA-T activity that might express a delay in a TCA cycle turnover and diminishing in compensatory GABA shunt activity. The changes observed were supposed to occur adaptively in response to the action of morphine and be composed of a number of metabolic changes either in GABAergic neurons, or surrounding astrocytes.

Key words: morphine, γ -aminobutyric acid (GABA), GABA-transaminase (GABA-T), SSA-dehydrogenase (SSA-DH), succinate dehydrogenase (SDH), NAD⁺-isocitrate dehydrogenase (NAD⁺-IDH), brain.

Опиатные наркотики относятся к наиболее употребляемым психоактивным веществам среди наркоманов Беларуси и России [2, 3]. В экспериментальных исследованиях при моделировании морфиновой наркомании применяется центральный наркотический анальгетик, морфина гидрохлорид, который используют в клинике для купирования болевого синдрома. При внутрибрюшинном введении морфин достаточно равномерно распределяется по отделам головного мозга, независимо от концентрации в них опиатных рецепторов [16]. Однократное введение крысам морфина в дозах 7,5-15 мг/кг (в/бр) приводит к снижению показателя локальной утилизации глюкозы в большинстве корковых структур, гиппокампе, лимбических и таламических ядрах [7]. Данные биохимических и фармакологических исследований свидетельствуют об участии системы γ -аминомасляной кислоты (ГАМК) в реализации ряда эффектов морфина, формировании толерантности и зависимости от наркотика [7]. Ферменты окислительной деградации ГАМК расположены в астроцитах, ок-

ружающих ГАМК-ергический синапс, и формируют так называемый ГАМК-шунт, напрямую связанный с реакциями ЦТК. Существует предположение, что в расчете на энергетический обмен в целом мозге анаплеротический ГАМК-шунт составляет около 17% от всей активности ЦТК, то есть в нервной ткани возможно превращения α -кетоглутаровой кислоты в сукцинат через переаминирование ГАМК [5, 9]. Интенсивность реакций катаболизма ГАМК различается в структурах мозга в зависимости от концентрации в них ГАМК-ергических путей и функционального состояния организма [5, 9, 15]. Согласно литературным данным, в ГАМК-ергических нейронах мозжечка преобладает путь превращения α -кетоглутарата через минорный ГАМК-шунт, и в этом отделе мозга обнаруживается наибольшая активность дегидрогеназы янтарного полуальдегида (ЯПА-ДГ) [6, 10]. По последним представлениям, анаплеротический ГАМК-шунт находится в тесной связи не только с реакциями цикла трикарбонных кислот, но и с обменом ряда нейроактивных аминокислот, и мо-

жет использоваться нервной тканью для восполнения дефицита энергетических субстратов при некоторых экстремальных воздействиях [5, 15].

Исходя из вышеизложенного, целью данного исследования явилось изучение влияния острой морфиновой интоксикации на состояние обмена ГАМК и ключевые реакции ЦТК в отделах мозга крыс с высокой плотностью ГАМК-ергических путей (ствол, мозжечок, таламическая область).

Методы исследования

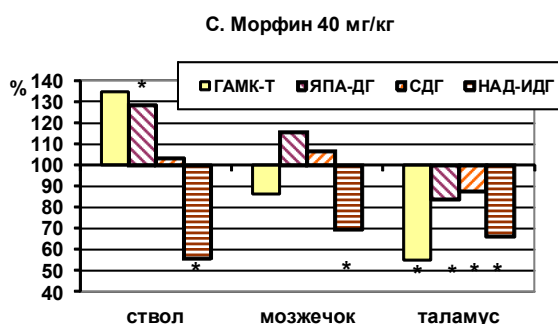
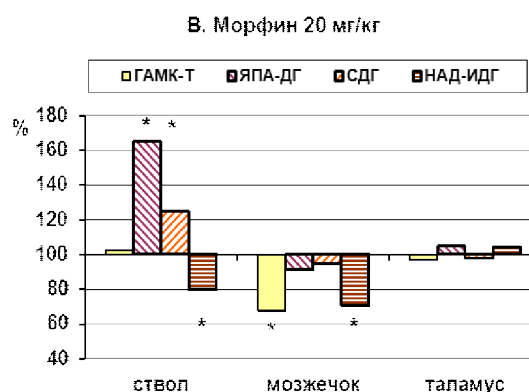
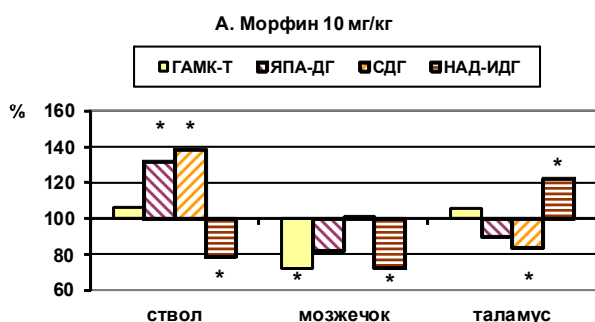
Эксперименты были выполнены на белых беспородных крысах-самцах массой 180-200 г. Животные были разделены на четыре группы по восемь особей в каждой из них. Контрольным животным вводили эквивалентные количества 0,9% раствора хлорида натрия. 1% раствор морфина гидрохлорида вводили однократно, внутривенно, в дозах 10 мг/кг, 20 мг/кг и 40 мг на килограмм массы тела. Через 1 час после инъекций морфина и физиологического раствора крыс декапитировали, извлекали головной мозг и выделяли ствол, мозжечок и таламическую область. В гомогенатах отделов мозга крыс определяли активность ферментов ЦТК - НАД⁺-зависимой изоцитратдегидрогеназы (НАД⁺-ИДГ: КФ 1.1.1.41) и сукцинатдегидрогеназы (СДГ: КФ 1.3.99.1) [4], а также ГАМК-шунта - ГАМК-аминотрансферазы (ГАМК-Т: КФ 2.6.1.19) и дегидрогеназы янтарного полуальдегида (ЯПА-ДГ: КФ 1.2.1.24) [8]. Белок определяли по Лоури [14]. Достоверность различий между группами оценивали параметрическим методом с применением t критерия Стьюдента.

Результаты и обсуждение

Введение морфина гидрохлорида в дозе 10 мг/кг оказало на животных легкое возбуждающее действие, тогда как более высокие дозы 20 и 40 мг/кг вызвали скорее седативный эффект. Результаты

воздействия однократного введения морфина на активность изученных ферментов отражены на рисунках А, В и С.

При введении морфина в дозе 10 мг/кг в стволе отмечено достоверное повышение активности ЯПА-ДГ и СДГ на 31,5% и 38,3%, соответственно, при снижении активности НАД⁺-зависимой дегидрогеназы по сравнению с контролем (Рис. А). В мозжечке крыс этой группы наблюдали уменьшение активностей НАД⁺-ИДГ (на 27,3%) и ГАМК-Т (на 27,7%) без достоверных сдвигов в активностях ЯПА-ДГ и СДГ. В таламической области достоверное угнетение активности СДГ на 16,5% сопровождалось активацией НАД⁺-ИДГ на 28,6% (Рис. А). Как известно, НАД⁺-зависимая изоцитратдегидрогеназа является ключевым регуляторным ферментом ЦТК, и снижение ее активности может свидетельствовать об общем замедлении оборота субстратов в цикле и угнетении производства энергии в нервных клетках [11]. Существует мнение, что роль митохондриальной НАД⁺-ИДГ в нервной ткани заключается не только в регуляции скорости потока субстратов в ЦТК, но и продукции важного промежуточного соединения - а-кетоглутаровой кислоты с целью образования нейромедиаторных аминокислот - глутамата и ГАМК [13]. Можно предположить, что в стволе и мозжечке однократное введение морфина вызвало умень-



Влияние острой морфиновой интоксикации на активность ферментов катаболизма ГАМК и ЦТК в отделах головного мозга крыс (в % к контролю, * - $p < 0,05$)

шение продукции а-кетоглутарата под действием НАД⁺-ИДГ, что, в свою очередь, способствовало угнетению в мозжечке активности ГАМК-Т. Совершенно очевидно, что активация НАД⁺-ИДГ в таламусе, вызванная морфином в дозе 10 мг/кг, привела к накоплению конечного продукта реакции - а-кетоглутаровой кислоты. Тем не менее, накопление а-кетоглутарата не способствовало активации ГАМК-трансаминазной реакции и повышению активности СДГ.

Увеличение дозы препарата до 20 мг/кг привело к аналогичным сдвигам ферментативной активности в изученных отделах мозга. Как и в предыдущей группе, в стволе активация дегидрогеназ сопровождалась угнетением НАД⁺-ИДГ. В мозжечке животных, получивших однократные инъекции наркотика в дозе 20 мг/кг, сохранилось угнетение активностей ГАМК-Т и НАД⁺-ИДГ по сравнению с контролем.

Однако в таламической области крыс не наблюдали достоверных изменений в активности изученных ферментов (Рис. В). Различные изменения активности ферментов, вызванные острым введением морфина, возможно, объясняются неоднородным распределением в ЦНС опиатных рецепторов и ГАМК-ергических нейронов. Наиболее выраженная энкефалин-подобная иммунореактивность и высокие концентрации опиатных рецепторов были обнаружены в медиальных ядрах таламуса, миндалине, фронтальной коре, стволе, базальных ганглиях [12]. Согласно литературным источникам, в мозжечке практически отсутствуют опиатные рецепторы, но имеется большое количество ГАМК-ергических проводящих путей и, следовательно, ферментов обмена ГАМК [1, 10, 12]. Можно предположить, что в этом отделе мозга эффект угнетения морфином ключевой реакции ЦТК и ГАМК-шунта происходит косвенным образом, за счет инициации каскада изменений в опиат-содержащих отделах ЦНС.

Введение крысам максимальной дозы морфина - 40 мг/кг - вызвало наиболее значительные сдвиги в активности изученных ферментов. Следует отметить, что данная доза оказала на животных сильно выраженное угнетение двигательной активности. При этом в стволе усилилось угнетение активности НАД⁺-ИДГ (на 44,4%) и сохранилась активация ЯПА-ДГ на 28,2% (Рис. С). В мозжечке крыс этой группы достоверное угнетение активности НАД⁺-ИДГ сопровождалось тенденцией к

снижению активности ГАМК-Т, тогда как в таламусе максимальная доза морфина привела к значительному угнетению активностей всех изученных ферментов катаболизма ГАМК и ЦТК (Рис. С), что свидетельствует о наиболее выраженном снижении оборота субстратов в ЦТК и уменьшении активности ГАМК-шунта. Вероятно, в этом отделе мозга высокая доза морфина способствовала угнетению как основного энергетического обмена, так и этого важного вспомогательного пути производства дополнительных субстратов. Очевидно, что следствием острой морфиновой интоксикации оказалось снижение в таламусе функциональной мощности ГАМК-шунта, которой было недостаточно для восполнения угнетенных реакций ЦТК.

Анализ результатов проведенного исследования показал, что однократное введение этого опиатного наркотика приводит к достоверным сдвигам в функционировании ферментов цикла Кребса и катаболизма ГАМК. Причем эти изменения усиливались по мере увеличения дозы морфина, а их направленность колебалась в зависимости от исследуемого отдела мозга. Во всех отделах мозга общим эффектом оказалось угнетение ключевой реакции ЦТК, на основании чего мы сделали вывод об общем замедлении этого цикла. Однако при этом в стволе активности СДГ и ЯПА-ДГ были повышены, особенно при дозах морфина 10 и 20 мг/кг. В мозжечке и таламусе, то есть отделах мозга с наиболее значимым вкладом ГАМК-шунта в энергетику клетки [6,9], угнетение НАД⁺-ИДГ сопровождалось снижением интенсивности ГАМК шунта. Этот эффект был наиболее выражен в таламической области при введении максимальной дозы морфина. Такие изменения в нервных клетках мозжечка и таламической области могли возникнуть адаптационно в ответ на прямое взаимодействие морфина с μ -рецепторами в тех отделах ЦНС, где они присутствуют. При этом морфин мог инициировать запуск косвенных метаболических сдвигов в ГАМК-ергических нейронах и в окружающих их астроцитах. На основании гипотезы о различной компартментализации энергетического обмена и обмена аминокислот в ГАМК-ергических нейронах и глии [15] мы можем заключить, что метаболические сдвиги, выявленные в данных отделах мозга, носят адаптационный характер и слагаются из комплекса изменений на уровне нейронов и окружающих их астроцитов

Дальнейшие исследования с использованием методов фракционирования нервной ткани и изменением других показателей ГАМК-ергической системы и цикла лимонной кислоты могли бы прояснить точные молекулярные механизмы воздействия морфина на головной мозг. Такие исследования были бы также полезны при изучении нейробиохимических механизмов формирования синдрома физической зависимости при хронической морфиновой интоксикации.

Литература

- Булаев В.М. Рецепторы опиатов и их лиганды. – Итоги науки и техники. Фармакология. Химиотерапевтические средства. – Москва, 1982. – Т. 13. – С. 101-184.
- Иванец Н.Н. Современные подходы к лечению наркологических заболеваний // Журнал неврологии и психиатрии. - 1997. - Т. 97, № 9. - С. 4-10.
- Козловский А.В., Виницкая А.Г., Лелевич В.В. Эпидемиологическая ситуация с потреблением психоактивных веществ в Республике Беларусь // Журнал ГГМУ. - 2003. - № 4. - С. 55-59.
- Прохорова М.И. // Методы биохимических исследований. Липидный и энергетический обмен. - Л.: Изд-во ЛГУ, 1982. - С. 188-226.
- Розанов В.А. Метаболическая роль ГАМК-шунта в центральной нервной системе при экстремальном состоянии // Успехи современной биологии. - 1989. – Т. 103, № 3. - С. 375-391.
- Розанов В.А., Карпович Г.А., Сергеева О.Н., Копелевич В.М., Гунар В.И. Влияние многократных инъекций ГАМК на ГАМК шунт и некоторые связанные с ним реакции в головном мозге крыс // Вопросы мед. химии. -1988. - № 1. - С. 29-33.
- Beck T., Wenzel S., Kuschinsky K., Kriege-Stein S. Morphine induced alterations of local cerebral glucose utilization in the basal ganglia of rats // Brain Research. -1989. - № 2. - P. 205-213.
- 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.
- 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.
- Hearl W., Churchich J. Interactions between 4-aminobutyrate aminotransferase and succinic semialdehyde dehydrogenase, two mitochondrial enzymes // J. Biol. Chem. – 1984. – Vol. 259. -p. 11459-11463.
- Hidaka M., Matsumae M., Yamamura M., Tsugane R., Sato O. Glucose metabolism and protective biochemical mechanisms in a rat brain affected by kaolin-induced hydrocephalus // Childs Nerv. Syst. - 1997. - Vol 13, N 4. - P. 183-188.
- Kruk Z.L., Pycok C.J. Neurotransmitters and drugs. – Croom Helm, London & Canberra., 1983. – P. 147-155.
- Kugler P., Vogel S. Microphotometric determination of enzymes in brain sections. IV. Isocitrate dehydrogenases // Histochemistry. -1991. -Vol. 95, N 6. - P. 629-633.
- Lowry O.H., Rosenbrough N.J., Farr A.L. Randall R.J. Protein measurement with the Folin reagent // J. Biol. Chem. - 1951.- Vol. 193. - P. 265-275.
- 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.
- Xu Zhenko, Wu Jiwen, Wong Bingkany Distribution of morphine after acute administration to rats // J. West China Univ. Med. Sci. – 1998. – Vol. 29, N 1. – P. 29-32.

Resume

PECULIARITIES OF γ -AMINOBUTYRIC ACID METABOLISM AND ACTIVITY OF THE TRICARBOXYLIC ACID CYCLE UNDER THE ACTION OF MORPHINE

H. Abazid, H. Vinitzkaya, V.V. Lelevich

The influence of acute morphine intoxication on the activity of the GABA-catabolising enzymes (GABA-transaminase and SSA-dehydrogenase) and the TCA cycle (succinate dehydrogenase, NAD⁺-isocitrate dehydrogenase) enzymes in brain stem, cerebellum and thalamus of rats has been studied. In all brain regions tested morphine administration exerted a dose-dependent inhibition of the NAD⁺-IDH and GABA-T activity that might express a delay in a TCA cycle turnover and diminishing in compensatory GABA shunt activity. The changes observed were supposed to occur adaptively in response to the action of morphine and be composed of a number of metabolic changes either in GABAergic neurons, or surrounding astrocytes.