

УДК 547.015+615.212.7.015.156.015.4

ВЛИЯНИЕ МОРФИНОВОЙ ИНТОКСИКАЦИИ НА АКТИВНОСТЬ ГАМК-ШУНТА В НЕКОТОРЫХ ОТДЕЛАХ ГОЛОВНОГО МОЗГА КРЫС

В.В. Лелевич¹, д.м.н., профессор; А.Г. Виницкая¹, к.б.н., доцент;
Х. Абазид², к.б.н.

1 - УО «Гродненский государственный медицинский университет», Гродно, Беларусь

2 - Университет «Аль Баас», Хомс, Сирия

Проведено сравнительное исследование активности ферментов катаболизма ГАМК и цикла трикарбоновых кислот (ЦТК) в отделах головного мозга крыс при моделировании острой и хронической морфиновой интоксикации. Наблюдаемые изменения параметров обмена ГАМК и ЦТК различались в зависимости от изучаемого отдела мозга, дозы морфина и длительности введения препарата. Выдвинуто предположение об опосредованной адаптации ГАМК-ергических нейронов в отделах мозга с различной концентрацией опиатных рецепторов на введение морфина.

Ключевые слова: *γ-аминомасляная кислота (ГАМК), ГАМК-шунт, сукцинатдегидрогеназа, НАД⁺-зависимая изоцитратдегидрогеназа, морфин, отделы головного мозга.*

The activities of the enzymes of GABA catabolism and tricarboxylic acid cycle (TCA) were studied in brain regions of the rats at acute and chronic morphine intoxication. The changes observed in the GABA metabolism and TCA differed in the brain regions tested and were dependant from the dosage and duration of morphine administration. 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 morphine administration.

Key words: *γ-aminobutyric acid (GABA), GABA-shunt, succinate dehydrogenase, NAD⁺-dependent isocitrate dehydrogenase, morphine, brain regions.*

Известно, что в нейрональных механизмах формирования пристрастия и физической зависимости от опиоидных наркотиков участвуют отдельные области головного мозга: гипоталамус, мезолимбическая дофаминовая система, кубовидное ядро, голубоватое место [2, 7]. Определенную роль играют нарушения в функционировании тормозной ГАМК-ергической системы ЦНС. При систематическом введении морфина крысам в ЦНС формируется устойчивый дефицит тормозных нейромедиаторов, что приводит к появлению признаков синдрома отмены наркотика и появлению признаков гипервозбудимости ЦНС [3, 7]. Между системой ГАМК и опиатными рецепторами имеется взаимодействие: в ряде регионов головного мозга m-опиатные рецепторы, агонистом которых является морфин, локализованы на пресинаптических мембранах ГАМК-ергических нейронов [2]. Интерес к изучению роли ГАМК в генезе опиоидной наркомании объясняется также уникальной метаболической ролью этой аминокислоты, метаболизм которой напрямую связан с циклом трикарбоновых кислот (ЦТК). Известно, что в головном мозге млекопитающих примерно 17% от всей активности ЦТК приходится на анаплеротический путь превращения ГАМК в субстраты ЦТК, называемый также «ГАМК-шунт» [5, 9].

Целью проведенных экспериментов явилось выяснение роли функциональных нарушений катаболизма ГАМК и ключевых реакций ЦТК в отдельных отделах головного мозга крыс при моделировании острой и хронической морфиновой интоксикации.

Материалы и методы исследования

Эксперименты были выполнены на белых беспородных крысах массой 180-200 г. При моделировании острой морфиновой интоксикации крысам вводили однократно, внутривенно (в/вр), 1% раствор морфина гидрохлорида в дозах 10 мг/кг, 20 мг/кг и 40 мг/кг массы тела. Контрольным животным в/вр вводили эквивалентные количества 0,9% раствора хлорида натрия.

При моделировании хронической морфиновой интоксикации (ХМИ) назначение 1% морфина гидрохлорида проводили по следующей схеме. 1-2 дня препарат вводили в/вр по 5 мг/кг массы тела дважды в сутки, 3-4 дни – по 10 мг/кг дважды в сутки. Начиная с 5 дня до конца эксперимента – по 20 мг/кг массы тела, в/вр, дважды в сутки. Сроки хронической морфиновой интоксикации составили 7, 14 и 21 суток. Контрольные животные получали двукратно в сутки эквивалентные количества 0,9% раствора хлорида натрия в течение всего времени эксперимента. Декапитацию крыс проводили через 1 час после последней инъекции морфина и физиологического раствора.

После декапитации крыс немедленно извлекали головной мозг и производили выделение стволовой части и мозжечка, которые немедленно замораживали в жидком азоте. 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. Достоверность различий между группами оценивали параметрическим методом с применением t критерия Стьюдента с учетом сравнения дисперсии, и после проверки нормальности выборочным критерием Колмогорова-Смирнова.

Результаты и обсуждение

По данным литературы, при внутривенном введении морфин равномерно распределяется по отделам головного мозга, независимо от концентрации в них опиатных рецепторов, достигая максимума через 1 час после инъекции [1, 7].

Мы исследовали влияние внутривенного однократного введения морфина в дозах 10, 20 и 40 мг/кг на состояние обмена ГАМК и ключевых реакций ЦТК в стволе и мозжечке головного мозга крыс (табл. 1).

Таблица 1 – Влияние однократного введения морфина гидрохлорида на активность ферментов обмена ГАМК и ЦТК в различных отделах головного мозга крыс (нмоль / мг белка / мин, n = 8)

Группы Показатели	I. Контроль	II. Морфин 10 мг/кг, в/бр	III. Морфин 20 мг/кг, в/бр	IV. Морфин 40 мг/кг, в/бр
Ствол				
ГАМК-Т	0,92±0,04	0,98±0,04	0,94±0,09	1,24±0,12
ЯПА-ДГ	7,16±0,52	9,42±0,52*	11,81±0,51*	9,18±0,59*
СДГ	21,47±0,85	29,70±0,87*	26,72±1,53*	22,15±0,95
НАД ⁺ -ИДГ	123,7±7,01	97,49±6,86*	97,84±4,67*	68,75±678*
Мозжечок				
ГАМК-Т	2,02±0,24	1,46±0,11*	1,37±0,14*	1,74±0,12
ЯПА-ДГ	15,93±0,95	13,01±0,86	14,47±0,35	18,38±0,71
СДГ	26,87±1,15	27,05±0,83	25,30±1,15	28,56±1,34
НАД ⁺ -ИДГ	203,2±10,49	147,7±5,28*	143,4±7,93*	141,2±10,36*

Примечание: * - p < 0,05 - достоверные различия между контрольной и опытными группами.

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 снижение двигательной активности, наиболее выраженное при введении максимальной дозы препарата.

При введении морфина в дозе 10 мг/кг в стволе было отмечено достоверное повышение активности ЯПА-ДГ и СДГ на 31,5% и 38,3% (p < 0,01), соответственно, при снижении активности НАД⁺-ИДГ на 21,2% (p < 0,05) по сравнению с контролем. В то же время в мозжечке крыс этой группы произошло уменьшение активностей НАД⁺-ИДГ на 27,3% (p < 0,05) и ГАМК-Т на 27,7% (p < 0,05) при неизменной активности ЯПА-ДГ и СДГ (табл. 1).

Увеличение дозы препарата до 20 мг/кг привело к аналогичным сдвигам ферментативной активности в стволе и мозжечке, как и в предыдущей группе (табл. 1). В стволе мозга активация ЯПА-ДГ и СДГ сопровождалась угнетением НАД⁺-ИДГ на 20,9% (p < 0,05), а в мозжечке животных, получивших однократные инъекции наркотика в дозе 20 мг/кг, сохранилось угнетение активностей ГАМК-Т и НАД⁺-ИДГ по сравнению с контролем.

Вариации в изменении активности ферментов метаболизма ГАМК и ЦТК, вызванном 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 [2]. Согласно литературным источникам, в мозжечке практически отсутствуют опиатные рецепторы, но имеется большое количество ГАМК-ергических проводящих путей и, следовательно, ферментов обмена ГАМК [2, 5, 9]. Можно предположить, что в этом отделе мозга эффект угнетения морфином ключевой реакции ЦТК и ГАМК-шунта осуществляется 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% (p < 0,001) и сохранилась активация ЯПА-ДГ на 28,2% (p < 0,05). В мозжечке крыс этой группы достоверное угнетение активности НАД⁺-ИДГ на 30,5% (p < 0,01) сопровождалось тенденцией к снижению активности ГАМК-Т (табл. 1).

Далее мы исследовали влияние хронической морфиновой интоксикации (ХМИ) различной длительности на активность ферментов катаболизма ГАМК и ключевых реакций ЦТК в стволе и мозжечке головного мозга крыс (рис. 1-2).

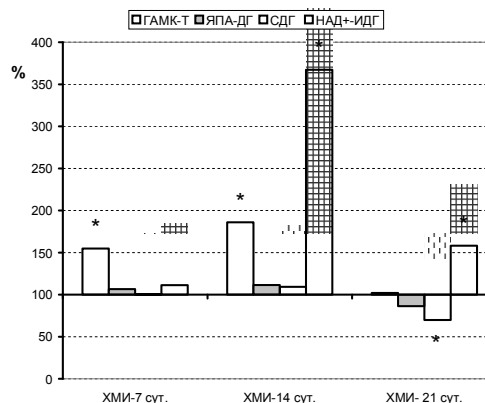


Рисунок 1 – Активность ферментов метаболизма ГАМК и ЦТК в стволе головного мозга крыс при хронической морфиновой интоксикации (ХМИ) различной длительности (в % к контролю; * – достоверные различия между контрольной и опытными группами)

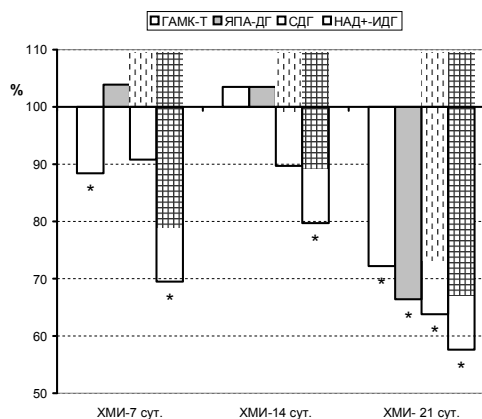


Рисунок 2 – Активность ферментов метаболизма ГАМК и ЦТК в мозжечке крыс при хронической морфиновой интоксикации (ХМИ) различной длительности (в % к контролю; * – достоверные различия между контрольной и опытными группами)

Внутрибрюшинное введение морфина крысам способствует развитию физической зависимости через 7-14 суток, а отмена наркотика приводит к появлению у них признаков абстинентного синдрома [3, 6]. Результаты нашего исследования показали, что длительность морфиновой интоксикации по-разному влияла на динамику изученных показателей в исследуемых отделах головного мозга (рис. 1-2).

7-дневное введение морфина привело к достоверной активации ГАМК-Т в стволе на 54,8% (p < 0,01), тогда как в мозжечке наблюдали угнетение активности этого фермента на 11,6% (p < 0,05). Активность ключевого фермента цикла Кребса – НАД⁺-зависимой ИДГ уменьшилась в мозжечке на 30,5% (p < 0,05). Во всех отделах мозга не изменилась активность второго фермента ГАМК-шунта – ЯПА-ДГ (рис. 1-2).

Увеличение морфиновой нагрузки до 14 суток привело к более выраженным изменениям в активности изу-

ченных ферментов. Как и в предыдущей группе, активность ГАМК-Т была выше контроля в стволе, однако в большей степени по сравнению с животными после 7-дневного введения морфина. Кроме того, активация ГАМК-Т в стволе сопровождалась значительным повышением активности НАД⁺-ИДГ на 267,7% ($p < 0,001$) (рис. 1). В мозжечке сохранилось угнетение активности НАД⁺-ИДГ без достоверных сдвигов в активности других ферментов (рис. 2).

При увеличении срока введения морфина до 21 суток в стволе мозга крыс этой группы наблюдали угнетение активности СДГ на 30,2% ($p < 0,05$) на фоне повышения активности НАД⁺-ИДГ на 58,2% ($p < 0,05$) (рис. 1). В мозжечке максимальная нагрузка морфином привела к значительному и достоверному угнетению активности всех изученных ферментов по сравнению с контролем и группами с меньшей по длительности морфиновой нагрузкой (рис. 2).

Из результатов проведенных исследований следует, что при однократном введении морфина общим эффектом для изученных отделов мозга оказалось угнетение активности ключевого фермента ЦТК – НАД⁺-ИДГ, на основании чего мы сделали вывод об общем замедлении скорости оборота субстратов ЦТК. Однако при этом в стволе активности СДГ и ЯПА-ДГ были повышены, особенно при дозах морфина 10 и 20 мг/кг. В мозжечке, то есть отделе мозга с наиболее значимым вкладом ГАМК-шунта в энергетику клетки [5], угнетение НАД⁺-ИДГ сопровождалось снижением интенсивности ГАМК-шунта. При продолжительном введении морфина в течение 7, 14 и до 21 суток в стволе головного мозга наблюдали повышение активности ферментов цикла Кребса на фоне компенсаторной активации катаболизма ГАМК. В мозжечке метаболические эффекты хронической морфиновой интоксикации напоминали действие однократного введения морфина, а именно, выраженное угнетение активности реакций ЦТК и ГАМК-шунта, особенно при максимальном сроке ХМИ (рис. 1-2).

Таким образом, результаты полученных данных подтвердили концепцию о лимитирующей роли обходного ГАМК-сукцинатного метаболического пути как существенного механизма энергетического обеспечения нервной ткани при интоксикации морфином. Причем наиболее значительно эта роль проявилась при хронической

морфиновой интоксикации, что явилось доказательством активного участия ГАМК, как нейротрофического фактора [9], при формировании опиатной зависимости. Полученные новые данные о нарушениях метаболизма ГАМК и энергетического обмена при морфиновой интоксикации могут быть полезны при разработке новых методов лечения опиоидной наркомании и направленной метаболической коррекции выявленных метаболических сдвигов. Наиболее перспективной группой препаратов могут быть модуляторы активности ГАМК-ергической системы и энергетического обмена.

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. / В.М. Булаев // *Итого 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 / В.А. Розанов // *Успехи соврем. биологии*. – 1989. – Т. 103, № 3. – С. 375-391.
6. Функциональная активность ГАМК-шунта и цикла трикарбоновых кислот в головном мозге морфинзависимых крыс / Х. Абазид [и др.] // *Весті НАН Беларусі. Сэр. мед. навук*. – 2005. – № 2. – С. 16-19.
7. Cami, J. Drug addiction / J. Cami, M. Farre // *The New Eng. J. of Medicine*. – 2003. – Vol. 349, N 10. – P. 975-986.
8. De Boer, Th. Assay and properties of 4-aminobutyric-2-oxoglutaric acid transaminase and succinic semialdehyde dehydrogenase in rat brain tissue / Th. De Boer, J. Bruinvels // *J. Neurochem*. – 1977. – Vol. 28. – P. 471-478.
9. Shi, Q. Mild reduction in the activity of the alpha-ketoglutarate dehydrogenase complex elevates GABA shunt and glycolysis / Q. Shi, O. Risa, U. Sonnewald // *J Neurochem*. – 2009. – Vol. 109, Suppl 1. – P. 214-221.

Поступила 29.06.2011