УДК 547.015+615.212.7.015.156.015.4

ОБМЕН ГАМК И СОДЕРЖАНИЕ НЕЙРОАКТИВНЫХ АМИНОКИСЛОТ В ГОЛОВНОМ МОЗГЕ КРЫС ПРИ ОДНОКРАТНОМ ВВЕДЕНИИ МОРФИНА ГИДРОХЛОРИДА

А.Г. Виницкая, М.Н. Курбат, В.В. Лелевич, А.В. Козловский

Гродненский государственный медицинский университет;
230015 г. Гродно, ул. Горького, 80, Беларусь;
тел.: (0152) 33-55-59; факс: (0152) 33-53-41; эл.почта: winanna@oic.unibel.by

Исследовали активности ГАМК-катаболизирующих ферментов (ГАМК-трансаминазы и дегидрогеназы янтарного полуальдегида), сукцинатдегидрогеназы, аланин- и аспартатаминотрансфераз, содержание ГАМК, глутамата, глутамина, аланина, аспартата и глицина в отделах головного мозга крыс при острой морфиновой интоксикации. Внутрибрюшинное (в/бр) введение морфина в дозе 10 мг/кг привело к увеличению уровня глутамата и уменьшению ГАМК и глицина в коре больших полушарий. При увеличении дозы морфина (до 20 и 40 мг/кг, в/бр) наиболее выраженные изменения были отмечены в стволовой части мозга, где располагается наибольшее количество опиатных рецепторов. В частности, уменьшение уровня глутамата в стволе сопровождалось накоплением его метаболических предшественников - глутамина и аспартата, а также уменьшением уровней тормозных аминокислот (ГАМК, глицина) при введении дозы 40 мг/кг. Полученные данные свидетельствуют о существовании дозозависимой связи между динамикой исследуемых показателей в ткани мозга и поведенческими эффектами морфина.

Ключевые слова: морфин, ГАМК-шунт, сукцинатдегидрогеназа, нейроактивные аминокислоты, аланинаминотрансфераза (АЛТ), аспартатаминотрансфераза (АСТ).

ВВЕДЕНИЕ. По последним статистическим данным, в Беларуси к наиболее употребляемым психоактивным веществам относятся наркотики опиатного ряда [1]. Накоплен достаточный фактический материал, доказывающий, что в основе развития физической зависимости от опиатов (в частности, морфина) лежат изменения на уровне метаболизма и функционирования нервной ткани [2,3]. Центральный наркотический анальгетик морфина гидрохлорид применяется в клинике для купирования болевого синдрома [2] и равномерно распределяется по отделам головного мозга независимо от концентрации в них опиатных рецепторов [4]. Внутрибрюшинное введение крысам морфина в дозах 7,5-15 мг/кг приводит к снижению показателя локальной утилизации глюкозы в большинстве корковых структур, гиппокампе, лимбических и таламических ядрах [5]. Имеются сведения об участии нейромедиаторных аминокислот возбуждения (глутамат, аспартат) и торможения (глицин, ГАМК) в проявлении действия алкоголя и опиатов, вызывающих физическую зависимость при длительном поступлении в организм [3,6-9]. Данные биохимических и фармакологических исследований свидетельствуют о вовлечении системы γ-аминомасляной кислоты (ГАМК) в реализацию ряда эффектов морфина, формирование толерантности и зависимости от наркотика [3,8]. Полагают, что около 17% от всей активности ЦТК в целом мозге приходится на обходной путь превращения α-кетоглутарата в сукцинат через переаминирование ГАМК, причем интенсивность ГАМК-шунта различается в структурах мозга в зависимости от концентрации в них ГАМК-ергических путей и функционального состояния организма [9,10]. По последним представлениям, анаплеротический ГАМК-шунт находится в тесной связи не только с реакциями цикла трикарбоновых кислот, но и обменом ряда нейроактивных аминокислот, и может использоваться нервной тканью для восполнения дефицита энергетических субстратов при некоторых экстремальных воздействиях [10,11].

Целью данного исследования явилась комплексная оценка изменений концентраций ряда нейроактивных аминокислот и определение особенностей их обмена в отделах мозга крыс с высокой плотностью ГАМК-ергических путей (большие полушария и ствол мозга) после однократного введения морфина гидрохлорида.

МЕТОДИКА. Эксперименты 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 эквиобъемные количества 0,9% раствора хлорида натрия. Морфина гидрохлорид вводили однократно, внутрибрюшинно в дозах 10 мг/кг, 20 мг/кг и 40 мг/кг массы тела в виде 1% раствора. Через 1 час после инъекций морфина и физиологического раствора крыс декапитировали, извлекали головной мозг и выделяли кору больших полушарий и стволовую часть мозга. По данным литературы, этот срок соответствует максимальному распределению морфина в отделах головного мозга после его однократного внутрибрюшинного введения [4]. В гомогенатах отделов мозга крыс определяли активность сукцинатдегидрогеназы (СДГ; КФ 1.3.99.1) [12], ГАМК-аминотрансферазы (ГАМК-Т; КФ 2.6.1.19) и дегидрогеназы янтарного полуальдегида (ЯПА-ДГ; КФ 1.2.1.24) [13], аланинаминотрансферазы (АЛТ: КФ 2.6.1.2) и аспартатаминотрансферазы (АСТ; КФ 2.6.1.1.) [12]. Белок определяли по методу Лоури [14]. Активность ферментов выражали в нмоль субстрата на миллиграмм белка в минуту. Содержание нейроактивных аминокислот (ГАМК, глутамат, глутамин, глицин, аланин, аспартат) в хлорных экстрактах структур мозга определяли посредством катионообменной хроматографии одноколоночным методом на автоматическом анализаторе аминокислот Т-339М по модифицированному методу Benson, Peterson [15]. Содержание аминокислот в отделах мозга выражали в нмоль/г ткани.

Достоверность различий между группами оценивали параметрическим методом с применением t критерия Стьюдента. Корреляционный анализ внутри групп животных проводили путем расчета коэффициента корреляции Пирсона в парах показателей и вычисления t критерия Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ. Исследованные аминокислоты находятся в тесных метаболических взаимоотношениях, и их согласованную работу доказывает проведенный корреляционный анализ внутри экспериментальных групп (табл. 1).

В контрольной группе расчет коэффициентов корреляции Пирсона выявил достоверные положительные связи в парах аспартат - ГАМК, ГАМК - глицин (кора, ствол), ГАМК-Т - ЯПА-ДГ, ЯПА-ДГ - СДГ (ствол) (табл. 1). По данным литературы, анализируемые аминокислоты занимают особое место в обмене веществ в нервной ткани, выполняя как трофическую (аланин, глутамин), так и нейромедиаторную функции (ГАМК, глутамат, аспартат) [11,16,17]. В ЦНС синтез глутамина из глутамата локализован в астроцитах, откуда он поступает в нейроны и используется для образования других аминокислот и субстратов ЦТК [18,19]. Согласно принятой гипотезе, в нейронах кортикальных структур располагаются различные субпопуляции митохондрий с высоким и низким оборотом субстратов в ЦТК. В первом случае высокая скорость ЦТК обеспечивает интенсивное образование АТР, во втором - из интермедиатов цикла Кребса синтезируются

ГАМК, глутамат и аспартат [20]. Полагают, что в нейронах коры больших полушарий имеется равное соотношение таких субпопуляций митохондрий, и, следовательно, приблизительно одинаковая интенсивность превращения α-кетоглутаровой кислоты обычным путем в ЦТК и через минорный ГАМК-шунт [18,21]. В отличие от коры, в стволе преобладает путь превращения α-кетоглутарата через минорный ГАМК-шунт [21], что согласуется с нашими данными о наличии в стволе положительной корреляции между ферментами обмена ГАМК (табл. 1).

Таблица 1 Достоверные значения коэффициента корреляции Пирсона (r; $p < 0{,}05$) в парах исследуемых показателей внутри групп животных

	Контроль	Морфин 10 мг/кг	Морфин 20 мг/кг	Морфин 40 мг/кг
	Кора больших полушарий			
аспартат - ГАМК	0,808	-	-	-
аспартат - глутамат	-	-	-	0,951
ГАМК - глутамат	-	-	-	-
ГАМК - глицин	0,957	-	-	-
ГАМК - ГАМК-Т	-	- 0,946	-	-
ГАМК-Т - ЯПА-ДГ	-	-	-	0,923
ЯПА-ДГ - СДГ	-	-	-	0,870
	Ствол			
аспартат - ГАМК	0,988	0,974	-	- 0.999
аспартат - глутамат	-	0,895	0,995	-
ГАМК - глутамат	-	0,914	-	-
ГАМК - глицин	0,998	0,982	-	0,999
ГАМК - ГАМК-Т	-	-	-	-
ГАМК-Т - ЯПА-ДГ	0,891	-	-	0,998
ЯПА-ДГ - СДГ	0,823	-	-	-

Примечание: В каждой группе было по 8 животных (прочерки означают недостоверные значения коэффициента)

На основании вышеизложенного и известного неравномерного распределения опиатных рецепторов в исследуемых отделах мозга [22], мы исследовали обмен и динамику этих аминокислот при действии различных доз морфина гидрохлорида.

Введение морфина гидрохлорида в дозе 10 мг/кг оказало на животных легкое возбуждающее действие. При этом, в коре больших полушарий наблюдали значительный прирост уровня глутамата на 155% и его предшественника глутамина - на 36%. Вместе с тем, содержание тормозных аминокислот ГАМК и глицина было снижено на 60% и 61%, а аланина - на 45,5% относительно контроля (рис. 1). Причем снижение концентрации ГАМК не сопровождалось изменением активности ГАМК-катаболизирующих ферментов в этом отделе мозга, а только угнетением СДГ на 16,7% (табл. 2). Известно, что в коре больших полушарий подавляющее количество ГАМК синтезируется при декарбоксилировании глутамата, и основными ее предшественниками являются глутамин и глутамат [23]. Можно предположить, что в коре больших полушарий изменения в уровнях глутамина, глутамата и ГАМК происходят вследствие угнетения морфином активности глутаматдекарбоксилазы в нервных окончаниях ГАМК-ергических нейронов. В литературе глутамат рассматривается как один из основных кортикальных нейромедиаторов возбуждения, и в корковых структурах обнаружена значительная плотность глутаматергических проводящих путей [23,24]. Таким образом, поведенческий возбуждающий эффект морфина в дозе 10 мг/кг может быть обусловлен дисбалансом в коре возбуждающих и тормозных нейромедиаторных аминокислот. В то же время, в стволе мозга крыс было обнаружено значительное снижение концентраций всех изученных аминокислот и отсутствие сдвигов в активности ферментов распада ГАМК (рис.2; табл. 2). Расчет коэффициентов корреляции Пирсона в этой группе животных выявил в коре потерю корреляции в парах аспартат - ГАМК и ГАМК - глицин, и появление отрицательной корреляционной связи между содержанием ГАМК и активностью ГАМК-Т. В стволе наблюдали нарушение взаимоотношений между ГАМК-катаболизирующими ферментами, сохранение связей в парах аспартат - ГАМК, ГАМК - глицин и появление связей между возбуждающими аминокислотами аспартатом и глутаматом, и метаболически родственным ГАМК глутаматом (табл. 1) Последнее наблюдение согласуется с однонаправленным характером изменения в стволе концентраций всех аминокислот, что, возможно, свидетельствует об адаптационных сдвигах в работе соответствующих метаболизирующих ферментов.

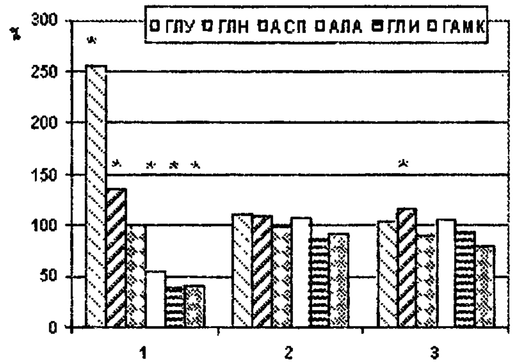

Рисунок 1.

Влияние однократного введения морфина гидрохлорида на содержание нейроактивных аминокислот в коре больших полушарий мозга крыс. (По оси ординат - концентрации аминокислот в % к контролю; по оси абсцисс - 1. - морфин 10 мг/кг, 2. - морфин 20 мг/кг, 3. - морфин 40 мг/кг. * - $p < 0,05$ по сравнению с контролем.)

Таблица 2. Влияние однократного введения морфина гидрохлорида на активность ферментов обмена нейроактивных аминокислот в головном мозге крыс

Группы Показатели	Контроль	Морфин 10 мг/кг,в/бр	Морфин 20 мг/кг,в/бр	Морфин 40 мг/кг,в/бр
Кора больших полушарий				
ГАМК-Т	2,14 ± 0,03	2,15± 0,1	1,62 ± 0,10 *	1,87 ± 0,07
ЯПА-ДГ	9,83 ± 0,18	10,39 ± 0,17	10,39 ± 0,07	11,89 ± 0,50
СДГ	29,54 ± 0,78	24,66 ± 0,55 *	25,49 ± 0,46 *	25,02 ± 0,72 *
АЛТ	32,52 ± 1,34	32,93 ± 1,75	40,03 ± 1,092 *	26,39 ± 0,89 *
АСТ	147,6 ± 3,88	146,6 ± 1,47	158,8 ± 4,36	133,0 ± 1,33
Ствол				
ГАМК-Т	1,78 ± 0,21	1,47 ± 0,09	1,58 ± 0,18	1,16 ± 0,04 *
ЯПА-ДГ	9,29 ± 0,38	9,86 ± 0,35	9,37 ± 0,47	7,15 ± 0,54 *
СДГ	20,14 ± 0,79	17,41 ± 1,06	16,45 ± 1,12 *	25,50 ± 1,58 *

Примечание: Представлены (нмоль/ мг белка/мин; n=8) средние величины (± ошибка средней) удельной активности ферментов в контроле и опыте. * - $p < 0,05$ - достоверные различия между контрольной и опытными группами.

При введении крысам морфина в дозах 20 и 40 мг/кг наблюдали снижение двигательной активности, наиболее выраженное при введении максимальной дозы препарата. В коре больших полушарий животных, получивших однократные инъекции наркотика в дозе 20 мг/кг, было отмечено снижение активности ГАМК-Т и СДГ (на 24,3% и 13,7%, соответственно), а также активация АЛТ на 23,1% по сравнению с контрольной группой (табл.2). Содержание изученных аминокислот не изменилось достоверно в этом отделе мозга, за исключением сохранения тенденции к повышению уровней глутамата и глутамина (рис 1). В стволе мозга крыс этой группы был отмечен значительный прирост уровней глутамата и глицина на 82,6% и 108,5% соответственно, и угнетение активности СДГ на 18,3% (табл 2, рис 2) Достоверную корреляционную связь выявили только в стволе между уровнями ГАМК, аспартата и глутамата, аналогично как в группе животных, получившей морфин в дозе 10 мг/кг (табл. 1).

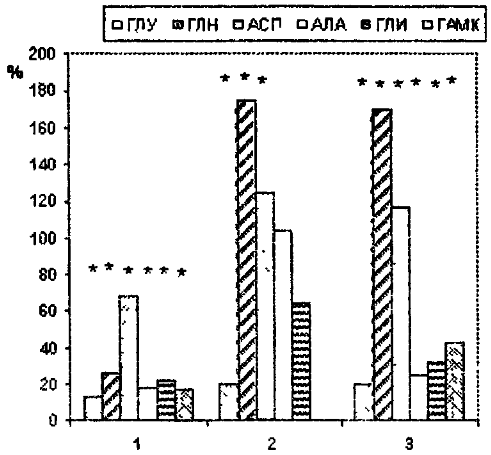

Рисунок 2.
Влияние однократного введения морфина гидрохлорида на содержание нейроактивных аминокислот в стволе мозга крыс. (По оси ординат - концентрации аминокислот в % к контролю; по оси абсцисс - 1 - морфин 10 мг/кг, 2. - морфин 20 мг/кг, 3 - морфин 40 мг/кг.
* - $p < 0,05$ по сравнению с контролем.)

Введение морфина в дозе 40 мг/кг вызвало в коре больших полушарий достоверное повышение уровня только глутамина и снижение активности СДГ и АлТ на 15,3% и 18,8% соответственно (табл 1; рис 1) При этом наличие положительных корреляционных связей между активностями ГАМК-Т, ЯПА-ДГ и СДГ (табл 1) может свидетельствовать о повышении функциональной роли ГАМК-шунта в формировании пула аминокислот при введении большой дозы морфина В стволе мозга животных этой группы наблюдали наиболее выраженный дисбаланс в уровнях нейроактивных аминокислот: концентрации глутамина и аспартата превышали контроль на 69,8% и 16,7%, а глутамата, аланина, глицина и ГАМК были ниже контроля соответственно на 81,3%, 75%, 68% и 51,5% (рис. 2) Наряду со снижением концентрации ГАМК в стволовой части мозга отмечается достоверное угнетение активности ферментов, участвующих в утилизации нейромедиатора - ГАМК-Т, ЯПА-ДГ и СДГ (табл. 2) Наличие отрицательной корреляционной связи между уровнями аспартата и ГАМК логически объясняет противоположный характер изменения этих показателей, показанный на рисунке 2.

Таким образом, введение морфина привело к наиболее выраженным изменениям исследуемых показателей в стволовой части мозга, где присутствует больше опиатных рецепторов [22] Повышение в коре уровней глутамата и глутамина при введении дозы 10 мг/кг и снижении уровней тормозных аминокислот, возможно, свидетельствует об активации возбуждения в моторных зонах коры, что и обусловило поведенческий эффект препарата При этом снижение в стволе уровней изученных аминокислот могло возникнуть адаптационно в ответ на взаимодействие морфина с μ-рецепторами. При повышении дозы вводимого наркотика в стволе, но не в коре больших полушарий происходит усиление дисбаланса между концентрациями тормозных и возбуждающих аминокислот. При этом накапливается глутамин - предшественник синтеза нейромедиаторов глутамата и ГАМК, повышается концентрация аспартата и снижается - глицина. Эти изменения свидетельствуют о торможении морфином в стволе мозга синтеза вышеуказанных нейромедиаторов, хотя активность ГАМК-Т была ниже контроля только при введении максимальной дозы препарата. Повышение дозы морфина до 40 мг/кг усилило наблюдаемый дисбаланс в уровнях тормозных и возбуждающих аминокислот. Наиболее выраженное угнетение катаболизма ГАМК в стволе мозга согласовывалось со снижением там содержания этой аминокислоты. Следовательно, можно утверждать, что морфин в этой дозе вызывает уменьшение оборота нейромедиаторных аминокислот, как за счет их синтеза, так и утилизации. Интересно, что в коре больших полушарий, где отмечена большая активность ЦТК по сравнению со стволом [21], активности СДГ и АЛТ были ниже контрольных значений. Можно предположить, что в этом отделе мозга данные изменения носили адаптационный характер, так как морфин мог оказывать здесь опосредованное воздействие. Таким образом, полученные результаты позволяют утверждать, что изученные нейроактивные аминокислоты являются важным патогенетическим звеном в проявлении острых эффектов морфина. Дальнейшие исследования этих показателей позволят выявить их роль в формировании синдрома зависимости при длительном введении опиатов.

Результаты работы позволили сделать следующие выводы:

1. Внутрибрюшинное введение морфина в дозе 10 мг/кг оказывает слабое возбуждающее действие на крыс, которое можно объяснить дисбалансом в коре больших полушарий между уровнями нейромедиаторов возбуждения (глутамата) и торможения (ГАМК, глицин).

2. В стволовой части мозга крыс, где располагается большее количество опиатных рецепторов, прослеживается дозозависимый эффект однократного введения морфина (20 и 40 мг/кг), что выражается в усилении дисбаланса тормозных (ГАМК, глицин) и возбуждающих (глутамат) аминокислот и накоплением их предшественников (глутамин, аспартат).

3. В коре больших полушарий введение морфина в дозах 20 и 40 мг/кг вызывает менее выраженные нарушения изученных показателей обмена аминокислот.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Козловский А.В., Лелевич В.В.. Виницкая А.Г., Максимчук В.П.* (2000) Медицинские новости, № 2, 34-36.
2. *Дубицкий А.Е., Беляев А.В.. Рыжий С.М.. Воликовская Е.В., Щегельский Д.А.* (1992) Клиническая хирургия, № 6, 53-57.
3. *Kreek M.J., Koob G.F.* (1998) Drug and Alcohol Dependence, **51**, 23-47.
4. *Matos F. Fatima, Rollema Hans, Taiwo Yetunde O., Levine Jon D., Basbaum A.I.* (1995) Brain Res., № 1-2, 187-195.
5. *Beck T., Wenzel S., Kuschinsky K., Kriege-Stein S.* (1989) Brain Res., № 2, 205-213.
6. *Ito M., Suda S., Namba H., Sokoloff L., Kennedy C.* (1983) J. Cerebral. Blood Flow Metab. **36**, 73-74.
7. *Kamınnikova N.P., Vinitskaya A.G., Doroshenko Ye.M., Zimatkin S.M.* (1997) Addict. Biol., № 2, 57-66.
8. *Beani L., Bianch C., Ferraro L., Morari M., Simonato M., Spalluto G., Tanganelli S.* (1991) J. Pharmacol. Exp. Ther., № 2, 472-476.
9. *Hassel B., Johannessen C.U., Sonnewald U., Fonnum F.* (1998) J. Neurochem., **71**, 1511-1518.

10. *Розанов В.А* (1989) Усп. совр. биологии, **107**, № 3, 375-391.
11. *Лелевич В.В., Виницкая А.Г., Дорошенко Е.М., Нефедов Л.И.* (2000) Нейрохимия, **17**, 202-206.
12. *Прохорова М.И.* (1982) Методы биохимических исследований. Липидный и энергетический обмен. Л., Изд-во ЛГУ.
13. *De Boer Th., Bruinvels J.* (1977) J. Neurochem., **28**, 471-478.
14. *Lowry O.H., Rozenbrough N.J., Farr A.L., Randall R.J.* (1951) J. Biol. Chem. **193**, 265-275.
15. *Нидервайзер А., Патаки Дж.* (1974) Новые методы анализа аминокислот, пептидов и белков. М., Мир.
16. *Сафаров М.И.* (2000) Укр. біохім. журн., **72**, 77-81.
17. *Westergaard N., Sonnewald U., Schousboe A.* (1995) Dev. Neurosci., **17**(4), 203-211.
18. *Sibson N R., Dhankhar A., Mason G.F., Rothman D.L., Behar K.L., Shulman R.G.* (1998) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **95**, 316-321.
19. *Shank P.R., Leo G.C., Zielke H.R.* (1993) J. Neurochem , **61**, 315-323.
20. *Waagepetersen H.S., Sonnewald U., Larsson O.M., Schousboe A.* (2000) Neurochem. Internat. **36**, 349-358.
21. *Розанов В.А., Карпович Г.А., Сергеева О.Н., Копелевич В.М., Гунар В.И.* (1988) Вопр. мед. химии., № 8, 29-33.
22. *Булаев В.М.* (1982) Итоги науки и техники. Фармакология. Химиотерапевтические средства. М., **13**, с. 101-184.
23. *Waagepetersen H.S., Sonnewald U., Larsson O.M., Shousboe A.* (1999) J. Neurosci. Res , **57**, № 3, 342-249.
24. *Dahchour A., De Witte P.* (2000) Pharmacol. Biochem. Behav., **65**, 345-350.

Поступила 12. 02. 2002 г.

GABA METABOLISM AND CONTENTS OF NEUROACTIVE AMINO ACIDS IN RAT BRAIN AFTER ACUTE MORPHINE ADMINISTRATION

A.G. Vinitskaya, M.N. Kurbat, V.V. Lelevich, A.V. Kozlovsky

Grodno Medical University, 80 Gorky Street, 230015 Grodno, Belarus
Tel.: (0152) 33-55-59; fax (0152) 33-53-41,
e-mail: winanna@oic.unibel.by

The activities of GABA-catabolizing enzymes (GABA-transaminase and succinic semialdehyde dehydrogenase), succinate dehydrogenase, alanine and aspartate amino transferases, the contents of GABA, glutamate, glutamine, alanine, aspartate and glycine were studied in rat brain regions after acute morphine administration. Intraperitoneal (i.p.) administration of 10 mg/kg morphine increased the glutamate level and decreased GABA and glycine levels in cortex. This may explain an excitable effect of morphine. When the higher doses of morphine were administered (20 and 40 mg/kg, i.p.), the most pronounced changes in the amino acids tested were observed in brain stem, possibly because of higher density of opiate receptors there. Decrease in glutamate level in the brain stem was accompanied by accumulation of its metabolic precursors glutamine and aspartate and decrease of inhibitory amino acids (GABA, glycine) leves, when the dose of 40 mg/kg was used. The data obtained indicate a dose-dependent relationship between the parameters studied and behavioral action of morphine.

Key word: morphine, GABA shunt, succinate dehydrogenase, neuroactive amino acids, alanine aminotransferase, aspartate aminotransferase