

УДК 547.015+615.212.7.01

©Коллектив авторов

ОСОБЕННОСТИ ОБМЕНА ГАМК И НЕЙРОАКТИВНЫЕ АМИНОКИСЛОТЫ В ГОЛОВНОМ МОЗГЕ БЕЛЫХ КРЫС В ДИНАМИКЕ МОРФИНОВОГО АБСТИНЕНТНОГО СИНДРОМА

А.Г. Веницкая, С.В. Лелевич, В.В. Лелевич, А.В. Козловский, Е.М. Дорошенко*

Центральная научно-исследовательская лаборатория, кафедра биологической химии, УО “Гродненский государственный медицинский университет”, Беларусь, 230015 Гродно, ул. Горького, 80; тел.: +374152335559; факс: +374152335341; эл. почта: narcology@grsmu.by

Проведено исследование свободных нейроактивных аминокислот, состояния обмена ГАМК и ЦТК в головном мозге крыс при моделировании морфинового абстинентного синдрома. Состояние отмены наркотика вызывали у животных путем прекращения инъекций морфина сроками на 1 час, 36 часов, 3 и 7 суток после предварительной 7-дневной морфиновой нагрузки. В коре больших полушарий крыс отмена морфина вызывает достоверное увеличение концентраций глутамата, глутамина, аспарагина и аланина, наиболее значительное в дальние сроки после отмены. В мозжечке мозга крыс на фоне отмены морфина наблюдали уменьшение уровней глутамина, аспарагина и увеличение – глицина при одновременном повышении активности ГАМК-Т и угнетении активности СДГ. По мере увеличения длительности отмены морфина в таламической области отмечается усиление угнетения активности ферментов катаболизма ГАМК. Наблюдаемые сдвиги в содержании аминокислот и активности изученных ферментов ГАМК-шунта могут свидетельствовать об опосредованной адаптации отделов мозга с различной концентрацией опиатных рецепторов на длительное введение наркотика.

Ключевые слова: морфиновый абстинентный синдром, ГАМК-шунт, аминокислоты, головной мозг.

ВВЕДЕНИЕ. Как известно, в формировании опиатной наркомании значительную роль играют нарушения взаимодействия нейромедиаторных систем [1-4]. Это касается практически всех изученных к настоящему времени нейротрансмиттеров: дофамина, норадреналина, серотонина, глутаминовой кислоты, γ -аминомасляной кислоты (ГАМК) и т.д. [2, 5, 6]. Данные биохимических и фармакологических исследований свидетельствуют о непосредственном участии системы ГАМК в формировании зависимости от алкоголя и опиатных наркотиков [7-9]. Нейроанатомической основой системы “награды”, ответственной за формирование феномена пристрастия к опиатам, являются дофаминергические

* - адресат для переписки

нейроны вентральной области, проецирующие аксоны в прилежащее ядро, миндалину, префронтальную кору и другие области переднего мозга через таламус, а также стволовые структуры [5, 6, 10]. Помимо дофамина и ГАМК, доказано участие глутамат- и глицинергических синапсов в формировании зависимости от опиатных наркотиков [6, 10]. При систематическом введении морфина крысам в ЦНС формируется устойчивый дефицит тормозных нейромедиаторов, что приводит к развитию синдрома отмены наркотика и появлению признаков гипервозбудимости ЦНС [1, 2, 6, 15]. Некоторые аминокислоты (аланин, аспарагин, глутамин) выполняют в ЦНС важную трофическую роль, являясь предшественниками нейромедиаторов или поставщиками субстратов в цикл трикарбоновых кислот (ЦТК) [11-14]. Причём около 17% от всей активности ЦТК в целом мозге приходится на анаплеротический путь превращения ГАМК в субстраты ЦТК [11, 12]. При хронической морфиновой интоксикации наблюдали нарушение метаболизма ГАМК и содержания её предшественников и некоторых других нейроактивных аминокислот [7, 8].

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

МЕТОДИКА. Эксперименты выполнены на 36 белых беспородных крысах самцах массой 180-200 г. Животные были разделены на 5 групп по 7-8 особей в каждой. Контрольным животным вводили эквивалентные количества 0,9% раствора хлорида натрия (I группа).

Хроническую морфиновую интоксикацию в подопытных группах вызывали путем внутрибрюшинного введения 1% раствора морфина гидрохлорида в течение 7 суток, дважды в сутки, используя общепринятые методики [15, 16]. Применяли следующий протокол введения: 1-2 сутки морфин вводили внутрибрюшино 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 (II группа), через 36 часов (III группа), 3 суток (IV группа) и 7 суток после последней инъекции морфина (V группа).

Крыс декапитировали, головной мозг делили на отделы согласно [17]. Выделяли кору больших полушарий, мозжечок и таламус, 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) [18], сукцинатдегидрогеназы (СДГ) и NAD^+ -зависимой изоцитратдегидрогеназы (NAD^+ -ИДГ) [19]. Белок определяли по методу Лоури. Параллельно в хлорных экстрактах структур мозга определяли содержание нейроактивных аминокислот (ГАМК, глутамат, глутамин, глицин, аланин, аспартат, аспарагин, таурин) методом ВЭЖХ [8]. Содержание аминокислот выражали в нмоль на грамм ткани, а активность ферментов – в нмоль/мг белка в минуту. Достоверность различий между группами оценивали параметрическим методом с применением t критерия Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ. Внутрибрюшинное введение крысам морфина в течение 7 суток приводит к формированию у них синдрома физической зависимости. Прекращение введения наркотика вызывает появление так называемого “натурального” абстинентного синдрома, который выражается в усилении агрессивности животных и появлении других признаков гипервозбудимости ЦНС [2, 15, 16]. 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 (II группа) не наблюдали статистически достоверных изменений в содержании исследуемых аминокислот, за исключением тенденции к повышению уровней глутамина и аспарагина и снижению уровня ГАМК (рис. 1). Активность ГАМК-Т достоверно не изменилась по отношению к контролю, а активность ЯПА-ДГ повысилась на 17,6% ($p<0,05$) (таблица). Увеличение срока отмены до 36 часов (III группа) 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 наблюдали активацию катаболизма ГАМК и NAD⁺-ИДГ.

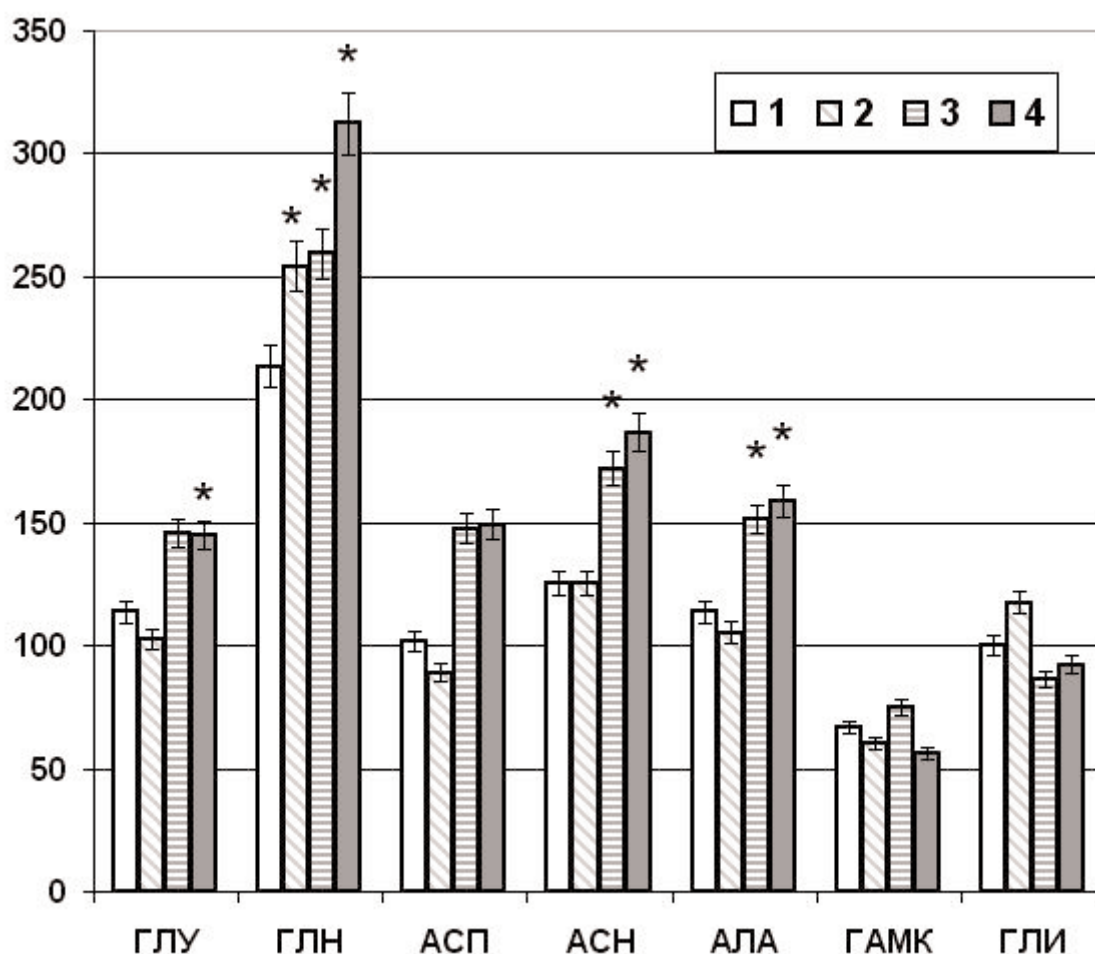


Рисунок 1.

Содержание нейроактивных аминокислот в коре больших полушарий мозга крыс в динамике морфинового абстинентного синдрома (МАС).

По оси ординат – концентрации исследуемых аминокислот в % к контролю.

По оси абсцисс – 1. – МАС-1 час; 2. – МАС-36 часов; 3. – МАС-3 суток; 4. – МАС-7 суток.

* $p<0,05$ по сравнению с контролем.

АМИНОКИСЛОТЫ В МОЗГЕ КРЫС ПРИ АБСТИНЕНЦИИ

Таблица. Активность ферментов ГАМК-шунта и ЦТК в отделах головного мозга крыс в различные сроки после отмены морфина (МАС).

Группы Показатели	I Контроль	II МАС – 1 час	III МАС – 36 час	IV МАС – 3 сут.	V МАС – 7 сут.
Кора больших полушарий					
ГАМК-Т	1,39±0,13	1,59±0,10	2,46±0,15 *	2,12±0,17 *	1,99±0,15 *
ЯПА-ДГ	9,12±0,33	10,73±0,32*	10,39±0,61	10,69±0,81	10,22±0,57
СДГ	44,88±2,73	52,55±3,07	49,20±4,08	46,83±1,76	47,94±3,95
NAD ⁺ -ИДГ	132,5±11,05	183,7±15,75	211,4±7,51*	103,6±5,03*	144,9±17,73
Мозжечок					
ГАМК-Т	3,16±0,25	3,37±0,31	4,11±0,31	4,71±0,35*#	5,86±0,02*#
ЯПА-ДГ	30,60±2,22	30,49±2,27	28,57±1,63	29,79±1,98	25,46±1,92
СДГ	91,29±2,68	80,43±3,19 *	78,99±2,04*	67,29±4,54*	101,9±1,9*#
Таламус					
ГАМК-Т	4,25±0,06	4,46±0,42	4,99±0,30	4,64±0,28	1,44±0,19*#
ЯПА-ДГ	36,67±1,68	35,45±1,29	22,93±0,98*#	22,2±0,94*#	19,9±0,41*#
СДГ	92,32±2,10	93,08±2,64	80,17±1,11*#	85,1±0,9*#	59,5±0,92*#
NAD ⁺ -ИДГ	173,3±19,3	375,2±28,2*	240,8±27,3*#	248,4±15,1*#	157,5±20,8#

Примечание: Активность ферментов выражена в (нмоль/мг белка×мин), представлены средние (± ошибка средней) величины удельной активности ферментов в контроле и опыте (n=8).

* p<0,05 достоверные различия между контрольной и опытной группами;

p<0,05 достоверные различия между II и III, IV и V группами.

Через 3 суток отмены (IV группа) значительно выросли уровни глутамина, аспарагина, аланина, на 159,4%, 71,9% и 51,4% соответственно. Одновременно проявилась тенденция к накоплению нейромедиаторов возбуждения (аспартата и глутамата) на фоне тенденции к снижению концентрации ГАМК. При этом, как и в III группе отмечена активация ГАМК-Т.

Увеличение срока отмены до 7 суток (V группа) привело в коре больших полушарий к трехкратному повышению уровня глутамина, а также 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). Во II группе отмечено снижение уровня глутамина на 56,3% (p<0,05) по отношению к контролю на фоне тенденций к уменьшению содержания глутамата, аспартата, аспарагина и аланина. Активности ферментов ГАМК-шунта не изменились, а активность СДГ снизилась на 21,9% (p<0,05) (таблица; рис. 2). Через 36 часов после отмены наркотика в III группе сохранилась тенденция к уменьшению уровня глутамина и аспарагина на фоне достоверного повышения концентрации глицина на 28,8% (p<0,05) (рис. 2). Отмечено также снижение активности СДГ. Через 3 суток отмены наблюдали тенденцию к уменьшению уровня глутамина и повышению концентрации глицина по отношению к контролю. В этой группе также повысилась активность ГАМК-Т на 49,9% (p<0,05) и снизилась - СДГ на 26,3% (p<0,05). На 7 суток МАС в мозжечке произошло снижение уровня глутамина на 51,9% (p<0,05), 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) (таблица; рис. 2).

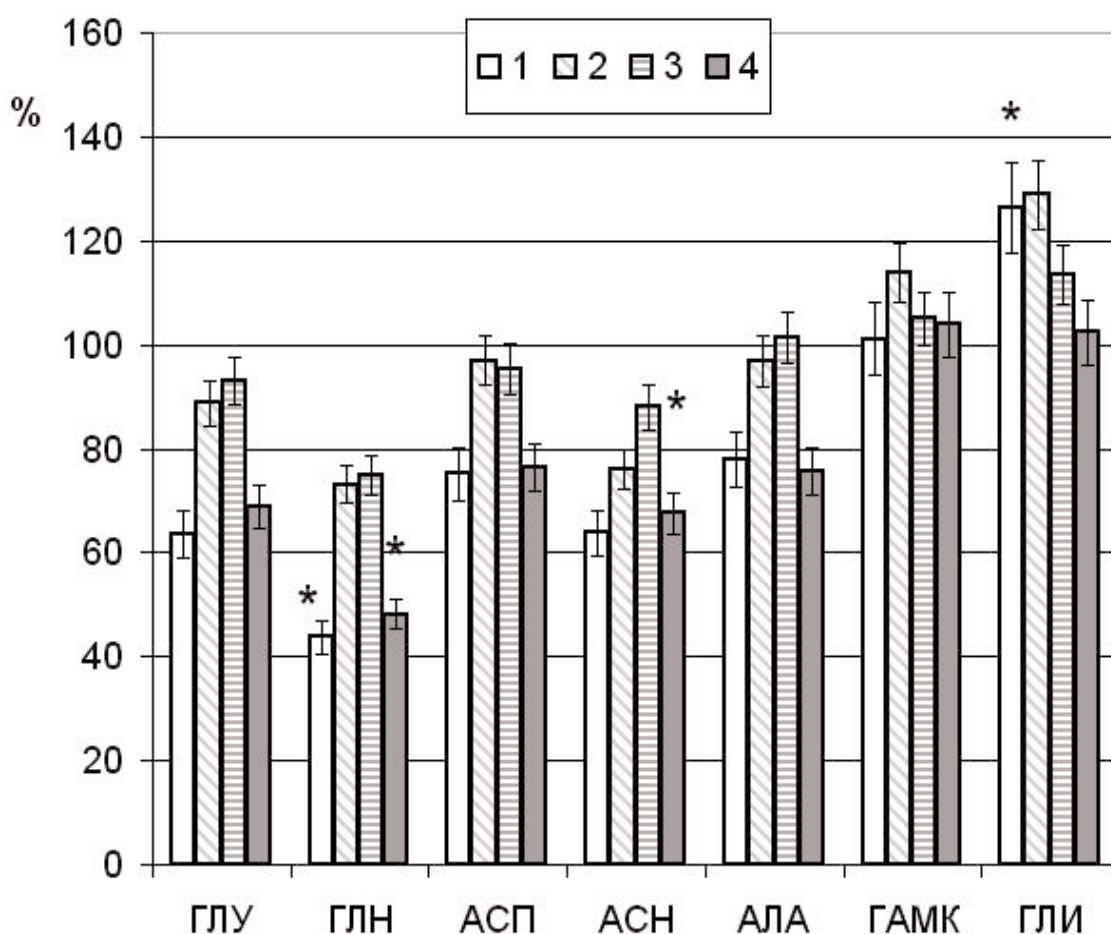


Рисунок 2.

Содержание нейроактивных аминокислот в мозжечке мозга крыс в динамике морфинового абстинентного синдрома (МАС).

По оси ординат – концентрации исследуемых аминокислот в % к контролю.

По оси абсцисс – 1. – МАС-1 час; 2. – МАС- 36 часов; 3. – МАС-3 суток; 4. – МАС-7 суток.

* $p < 0,05$ по сравнению с контролем.

В таламической области достоверное снижение уровня таурина (на 66,9%; $p < 0,01$) наблюдали только через 36 часов после отмены наркотика. Уровни остальных изученных аминокислот достоверно не изменились во всех подопытных группах. Наибольшие изменения произошли в активности ГАМК-метаболизирующих ферментов и ферментов ЦТК. Через 36 часов, 3 и 7 суток отмены значительно уменьшилась активность мембраносвязанных дегидрогеназ – ЯПА-ДГ и СДГ как в сравнении с контролем, так со II группой. В то же время, достоверное снижение активности первого фермента катаболизма ГАМК – ГАМК-Т (на 66,2%; $p < 0,001$) произошло только в группе крыс с максимальным сроком отмены (таблица).

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-, глуматергических нейронов, в которых сосредоточено наибольшая часть

ферментов метаболизма ГАМК и исследуемых аминокислот [4, 10]. 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 [1, 4, 6, 9]. Наибольшая плотность опиатных рецепторов, определённая радиоиммунными методами, была обнаружена в коре больших полушарий, таламусе, стволовых структурах, тогда как они почти отсутствовали в мозжечке головного мозга млекопитающих [4, 9, 10].

Проведенные исследования показали, что в коре больших полушарий через 1 час после последней инъекции морфина происходит некоторое усиление накопления глутамина и аспарагина - известных форм запасаания аминного азота в нервной ткани [13]. 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. Эти результаты в определенной мере согласуются с данными других исследователей, наблюдавших снижение активности тормозных нейромедиаторных систем в ЦНС после продолжительного введения опиатных наркотиков [2, 6, 9]. 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 AMDA- и NMDA- рецепторов [10, 14]. 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 [13]. По другим данным, аланин выполняет в ЦНС важную функцию переноса аминок групп между глией и нейронами, а также используется как источник пирувата [11, 14]. 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 соединений с запасающей функцией на фоне прекращения поступления наркотика.

В отличие от коры больших полушарий, в мозжечке практически отсутствуют опиатные рецепторы [4], но имеется большое количество ГАМК-ергических вставочных нейронов и ферментов обмена нейромедиатора [10, 20]. 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). Содержание ГАМК достоверно не изменилось, а уровень другого тормозного нейромедиатора – глицина, увеличился только в III группе. В этом отделе мозга уменьшение концентраций нейромедиаторов возбуждения – глутамата и аспартата, на фоне повышения уровня глицина 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. В таламусе головного мозга крыс отмена морфина привела к значительному угнетению катаболизма ГАМК, особенно в дальние сроки отмены.

Как известно морфин, являясь агонистом μ -опиатных рецепторов, способен моделировать 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 [21]. Следовательно, выявленные изменения внутримитохондриальных реакций – ЦТК и катаболизма ГАМК, могут быть вызваны модулированием морфином аденилатциклазной системы. Согласно гипотезе, выдвинутой в 80-е годы В.А. Розановым [12], 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, мозжечке и таламусе в динамике МАС могут быть обусловлены реакцией нейронов этих отделов мозга на прекращение инъекций морфина на фоне хронической морфиновой интоксикации. Изменение в концентрациях ГАМК и метаболически близких ей аминокислот, вероятно, является следствием различной модуляции морфином ферментов обмена этих аминокислот в этих отделах мозга, в которых постулируется неравномерное распределение μ -опиатных рецепторов в исследуемых отделах мозга и их необязательное сопряжение с ГАМК-ергическими нейронами [1, 4]. 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 здесь другими причинами, не связанными с непосредственной модуляцией морфином ГАМК-ергических нейронов.

Работа выполнена при поддержке гранта Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований Б04-149.

ЛИТЕРАТУРА

1. Панченко Л.Ф., Тербилина Н.Н., Гуревич К.Г. (2002) Нейрохимия, **19**(1), 26-32.
2. Головки А.И., Леонтьева Л.В., Головки С.И., Романенко О.И., Коноплин Д.А., Руднев В.В. (2003) Нейрохимия, **20**(4), 245-258.
3. Виницкая А.Г., Курбат М.Н., Лелевич В.В., Козловский А.В. (2005) Биомед. химия, **51**, 295-302.
4. Булаев В.М. (1982) Рецепторы опиатов и их лиганды. Итоги науки и техники. Фармакология. Химиотерапевтические средства. Москва, **13**, 101-184.
5. De Vries T.J., Shippeberg T.S. (2002) J. Neurosci., **22**(9), 3321-3325.
6. Vetulani J. (2001) Pol. J. Pharmacol., **53**, 303-317.
7. Курбат М.Н., Лелевич В.В. (2002) Экспер. клин. фармакол., **65** (5), 27-28.
8. Лелевич В.В., Абазид Х., Виницкая А.Г., Дорошенко Е.М. (2005) Нейрохимия, **22**(1), 38-43.
9. Cami J., Farre M. (2003) New Eng. J. Med., **349**, 975-986.
10. Kruk Z.L., Pycok C.J. (1983) Neurotransmitters and drugs. Croom Helm, London & Canberra. pp. 147-155.
11. Hassel B., Johannessen C.U., Sonnewald U., Larsson O.M. (1998) J. Neurochem., **71**, 1511-1518.
12. Розанов В.А. (1989) Усп. соврем. биол., **103**(3), 375-391.
13. Waagepetersen H.S., Sonnewald U., Larsson O.M., Schousboe A. (2000) J. Neurochem., **75**, 471-479.
14. Waagepetersen H.S., Sonnewald U., Schousboe A. (2003) Neuroscientist, **9**(5), 398-403.

АМИНОКИСЛОТЫ В МОЗГЕ КРЫС ПРИ АБСТИНЕНЦИИ

15. Панченко Л.Ф., Перегуд Д.И., Яковлев А.А., Онуфриев М.В., Степаничев М.Ю., Лазарева Н.А., Павлова Т.В., Баронец В.Ю., Гуляева Н.В. (2004) Биомед. химия, **50**, 460-470.
16. Константинопольский М.А., Суркова Л.А., Тюрина И.В., Судаков С.К. (1992) Экспер. клин. фармакол., **55**(2), 9-11.
17. Glowinsky I., Iversen L.L. (1986) J. Neurochem., **13**(8), 655-669.
18. De Boer Th., Bruinvels J. (1977) J. Neurochem., **28**, 471-478.
19. Прохорова М.И. (1982) Методы биохимических исследований. Липидный и энергетический обмен. Л.: Изд-во ЛГУ, с. 188-226.
20. Fonnum F. (1987) in: Psychopharmacology. The third generation of progress. (Meltzer H.Y., ed.) Raven Press, New York, pp. 173-182.
21. Медведев А.Е., Труфанова Л.В., Голубенко А.В., Кулинский В.И. (1990) Биохимия, **55**, 225-231.

Поступила: 10. 05. 2006.

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

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

Central Research Laboratory, Department of Biochemistry, Grodno Medical University,
ul. Gorkogo, 80, 230015 Grodno, Belarus; tel. +375 152 33-55-59; fax +375 152 33-53-41;
e-mail: narcology@grsmu.by

The changes in the neuroactive amino acid contents, GABA metabolism and TCA reactions have been studied in rat brain regions under experimental morphine withdrawal (MW). MW was developed by means of the cessation of morphine intraperitoneal injections 1 and 36 hours, 3 and 7 days after the course of morphine administration for 7 days. In cortex the significant increase in the contents of glutamate, glutamine, asparagine, and alanine was observed in remote terms of MW. In cerebellum MW led to the decrease in the levels of glutamine and asparagine and increase in glycine level, followed by the GABA-transaminase activation and the succinate dehydrogenase inhibition. In thalamus prolongation of MW caused to the further inhibition of the activities of the GABA-catabolising enzymes. The changes 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.

Key word: morphine withdrawal, GABA shunt, amino acids, brain.