

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

УДК 615.015.6+613.83

© Коллектив авторов

### ВЛИЯНИЕ СИНДРОМА ОТМЕНЫ МОРФИНА НА ПОКАЗАТЕЛИ СВОБОДНОРАДИКАЛЬНОГО ГОМЕОСТАЗА И СИСТЕМУ ОКСИДА АЗОТА В ПЕЧЕНИ И ТИМУСЕ КРЫС

*Л.Ф. Панченко<sup>1</sup>, Д.И. Перегуд<sup>1</sup>, А.А. Яковлев<sup>2,3</sup>, М.В. Онуфриев<sup>2</sup>,  
М.Ю. Степаничев<sup>2</sup>, Н.А. Лазарева<sup>2</sup>, Т.В. Павлова<sup>2</sup>, В.Ю. Баронец<sup>1</sup>, Н.В. Гуляева<sup>2</sup>*

<sup>1</sup>Национальный научный центр наркологии МЗ РФ, 119002 Москва, Мал. Могильцевский пер., 3, тел./факс (095) 2419590, эл. почта: biochn@mail.ru

<sup>2</sup>Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН, Москва

<sup>3</sup>Московский физико-технический институт, Долгопрудный, Московской области

Исследованы показатели окислительного стресса, метаболизма оксида азота (NO) и активность ключевого фермента апоптоза - каспазы-3 во время синдрома отмены морфина в печени и тимусе крыс. Крысам-самцам Wistar в течение 6 дней дважды в сутки вводили морфин гидрохлорид внутривенно в возрастающих дозах от 10 мг/кг до 100 мг/кг. Через 36 часов после последней инъекции препарата по специфическим вегетативным и двигательным признакам установили выраженный спонтанный синдром отмены морфина. В период синдрома отмены отмечено снижение массы тела и тимуса животных. Показано, что в печени, но не в тимусе, после отмены морфина наблюдается выраженный окислительный стресс, сопровождающийся повышением активности аспартатаминотрансферазы и гамма-глутамилтранспептидазы в сыворотке крови. Активность  $Ca^{2+}$ -зависимой изоформы синтазы оксида азота (NOC) в печени увеличивается, а  $Ca^{2+}$ -независимой NOC уменьшается, при этом общая активность NOC в печени и тимусе остается неизменной. Концентрация нитратов/нитритов в крови снижается, в тимусе повышается, а в печени не изменяется. Изменения активности каспазы-3 ни в печени, ни в тимусе не наблюдалось. Данные обсуждаются в свете возможной антиоксидантной и антиапоптотической роли NO при синдроме отмены морфина.

**Ключевые слова:** синдром отмены морфина, окислительный стресс, оксид азота, каспаза-3, печень, тимус

**ВВЕДЕНИЕ.** Одним из самых важных негативных последствий хронического потребления морфина является физическая зависимость, и, как следствие, развитие абстинентного синдрома при его отмене. При хроническом воздействии морфина, кроме развития физической зависимости, характеризуемой специфическими поведенческими нарушениями, возникают различные соматические расстройства. Гепатотоксичность и развитие иммунодефицитного состояния - характерные проявления соматической патологии, вызванной морфином.

Данные зарубежных исследователей, а также результаты собственных экспериментов, свидетельствуют о развитии окислительного стресса в печени, сердце и мозге крыс в условиях хронической морфинизации и при синдроме

### ОТМЕНА МОРФИНА И СВОБОДНОРАДИКАЛЬНЫЙ ГОМЕОСТАЗ

отмены морфина. При этом в печени происходит накопление продуктов, реагирующих с тиобарбитуровой кислотой (ТБК-РП) [1], снижение уровня небелковых сульфгидрильных групп (SH-групп) (глутатиона) [2], истощение элементов антиоксидантной защиты таких, как  $\beta$ -каротин и аскорбиновая кислота [3]. Хроническое введение морфина приводит не только к истощению количества низкомолекулярных антиоксидантов, но и к снижению активности ферментов участвующих в антиокислительной защите, таких как супероксиддисмутаза (СОД), каталаза, глутатионпероксидаза и глутатионредуктаза [4]. Перечисленные изменения свидетельствуют об активации свободнорадикальных процессов в печени под действием морфина. Окислительный стресс приводит к нарушению функциональной и структурной целостности клеток печени, и, как следствие, развивается гиперферментемия. Так известно, что при морфинизации повышается активность аланинаминотрансферазы (АЛТ) и аспаратаминотрансферазы (АСТ) в сыворотке крови [5]. Свободнорадикальный гомеостаз при синдроме отмены морфина в тимусе до настоящего времени не исследован.

Хроническая интоксикация опиатами характеризуется высокой подверженностью к инфекционным заболеваниям, что связано с развитием иммунодефицита [6]. В экспериментах на животных показано, что продолжительное воздействие морфина сопряжено с иммунологическими нарушениями, такими как снижение содержания лимфоцитов в тимусе и его атрофия [7], снижение активности натуральных киллеров [8], нарушение синтеза антител [9].

В последнее время большое внимание уделяется NO как медиатору многих физиологических и патологических процессов в организме млекопитающих. NO - свободнорадикальная биологически активная молекула, обладающая высокой реакционной способностью. В зависимости от ряда условий NO может выступать в роли как прооксиданта так и антиоксиданта. Эндогенным предшественником NO является аминокислота L-аргинин. Реакцию образования NO из L-аргинина катализирует фермент синтаза оксида азота (NOS), который представлен тремя изоформами: кальций-зависимыми нейрональной (nNOS) и эндотелиальной (eNOS), а также кальций-независимой индуцибельной (iNOS) [10]. NO представляет собой внутри- и межклеточный мессенджер, участвующий в регуляции функций желудочно-кишечного тракта, иммунной, сердечно-сосудистой и нервной систем. В печени в норме экспрессируется только eNOS, обеспечивая адекватный кровоток [11]. При патологических состояниях, затрагивающих печень (эндотоксемия, геморрагический шок, ишемия-реперфузия, сепсис, инфекция, воспаление), активируется iNOS, которая экспрессируется купферовскими клетками, гепатоцитами и эндотелиальными клетками [11]. NO является важным медиатором воспалительных и инфекционных процессов в печени. NO выполняет определенные функции в иммунном ответе: участвует в неспецифической иммунной защите, проявляет противоопухолевую активность, участвует в процессах иммуномодуляции (за счет регуляции синтеза цитокинов, хемокинов, ростовых факторов) [12]. Центральный орган иммунной системы - тимус, в нем происходит созревание Т-лимфоцитов. NO способен регулировать развитие лимфоцитов [12]. В тимоцитах постоянно экспрессируется только кальций-зависимая NOS, однако, в эпителиальных и дендритных клетках соединительной ткани тимуса конститутивно экспрессируется кальций-независимая изоформа [12]. Работы, посвященные метаболизму NO в печени в условиях воздействия опиатов, ограничиваются исследованиями влияния однократной инъекции производных морфина на индуцированную липополисахаридом (ЛПС) экспрессию iNOS. Так, показано что введение морфин-6-глюкуронида и героина приводит к снижению, индуцированной ЛПС экспрессии iNOS и её мРНК в печени крыс [13, 14]. Работ, посвященных влиянию опиатов на метаболизм оксида азота в тимусе, до сих пор не было проведено.

В последнее время уделяется большое внимание NO как регулятору апоптоза. Влияние NO на развитие апоптоза, в частности, на активность

ключевого фермента апоптотического каскада каспазы-3 крайне неоднозначно, NO может выступать в качестве как проапоптогена, так и антиапоптогена [15]. Запрограммированная гибель клеток (апоптоз) играет фундаментальную роль в клеточном и тканевом гомеостазе [16], онтогенезе многоклеточного организма [17], патогенезе различных заболеваний [18]. В клетке апоптоз реализуется через стадию активации протеолитических ферментов семейства каспаз. Эффекторные каспазы выполняют генетически детерминированную программу гибели, расщепляя многочисленные внутриклеточные белки [19]. Среди эффекторных каспаз каспаза-3 является наиболее активной и часто активируемой протеазой [20]. В физиологических условиях в печени апоптоз практически не представлен (только 5 на 10000 клеток (гепатоциты и холангиоциты) погибают по апоптотическому пути) [21]. Однако под действием ряда токсинов, лекарств, вирусных инфекций может активироваться апоптотический каскад, что приводит к разрушению ткани [21]. Апоптоз постоянно протекает в ткани тимуса, при развитии и созревании тимоцитов, когда происходит элиминация потенциально аутореактивных клеток [22]. Показано, что хроническое подкожное введение морфина крысам приводит к интенсификации апоптоза в тимусе [23], аналогичных исследований в печени не проведено.

Целью нашей работы явилась оценка метаболизма оксида азота и активности каспазы-3 в условиях окислительного стресса печени, вызванного отменой морфина. Кроме того, вышеуказанные показатели определяли в тимусе.

**МЕТОДИКА.** В работе использовали 14 крыс-самцов Wistar в возрасте 6 мес массой 250-350 г. Животных содержали по пять особей в клетке при искусственном цикле освещения (день 08.00-20.00, ночь 20.00-08.00) и свободном доступе к воде и пище.

В ходе эксперимента были сформированы опытная (хроническое введение морфина и последующая его отмена) и контрольная группы. Животные контрольной группы получали изотонический раствор хлорида натрия. Морфин гидрохлорид вводили внутривентриально по схеме [24, 25] в течение 6 дней два раза в сутки (в 10.00 и 20.00) в возрастающих дозах 10-100 мг/кг. Спонтанный абстинентный синдром оценивали через 36 часов после завершающей инъекции морфина в "открытом поле" (арена диаметром 120 см и высотой стенок 40 см). Выраженность абстинентного синдрома оценивали в течение 5 мин по ряду специфических двигательных (отряхивания "мокрой собаки", прыжковая активность, корчи, жевание, скрип зубами, встряхивание передними лапами) и вегетативных признаков (диарея, потоз, ринорея, пилоэрекция, диспноэ, писк при дотрагивании, агрессивность) [24, 26]. Если было возможно, наблюдаемые признаки регистрировали количественно с дальнейшим присвоением каждому признаку балла, зависящего от специфичности признака. Выраженность абстинентного синдрома представляли в виде суммы баллов. На протяжении эксперимента животных ежедневно взвешивали. Крыс обеих групп декапитировали сразу после оценки синдрома отмены морфина. Для биохимических исследований использовали плазму крови, печень и тимус.

После декапитации крыс кровь из сонных артерий собирали в пробирки с раствором ЭДТА в качестве антикоагулянта, которые затем центрифугировали при 1500 g 15 мин при 4°C и полученную плазму, а также эритроцитарную массу аликвотировали и до исследования хранили при - 40°C. Тимус сразу помещали в ледяной 0,9% раствор хлорида натрия, отделяли кровеносные сосуды и соединительную ткань, затем замораживали в жидком азоте. Печень крыс перфузировали охлажденным изотоническим раствором хлорида натрия, после чего вынимали и замораживали в жидком азоте. До исследования все образцы хранились при - 40°C.

Выделенные ткани гомогенизировали в гомогенизаторе Potter S в течение 3 мин при 1500 об/мин в 5 объемах 20 mM HEPES (pH 7,5) при 4°C. Часть гомогенатов аликвотировали для определения сульфгидрильных групп (SH-групп)

## ОТМЕНА МОРФИНА И СВОБОДНОРАДИКАЛЬНЫЙ ГОМЕОСТАЗ

и продуктов, реагирующих с тиобарбитуровой кислотой (ТБК-РП). Оставшуюся часть гомогенатов центрифугировали 30 мин при 11000g при 4°C, часть полученных супернатантов отбирали для определения нитратов и нитритов ( $\text{NO}_x$ ) и супероксид-перехватывающей активности (СПА). В оставшуюся часть добавляли охлажденный 20 мМ НЕРЕС (рН 7,5), содержащий 0,5 мМ этилендиаминтетраацетат (ЭДТА), 1 мМ дитиотреитол (ДТТ), 1 мМ фенолметилсульфонилфторид (ФМСФ), апротинин и лейпептин по 5 мкг/мл. Супернатанты печени дополнительно центрифугировали 1 час при 105000 g и 4°C для получения цитозоля, в котором определяли активность NOC.

Активность аспаратаминотрансферазы (АСТ), аланинаминотрансферазы (АЛТ), гамма-глутамилтранспептидазы (ГГТП), креатинфосфокиназы (КФК), гамма-бутирилдегидрогеназы (ГБДГ), а также содержание мочевой кислоты в плазме крови определяли с помощью диагностических наборов DiaSys (Германия).

Для исследования свободнорадикального гомеостаза мы использовали следующие показатели: концентрация SH-групп (небелковых и общих) и ТБК-РП, а также активность СОД. Для определения общих SH-групп в печени и плазме, а также небелковых SH-групп в печени применяли метод с использованием реактива Элмана (ДТНБ), предложенный Sedlak и Lindsay [27]. Для определения небелковых SH-групп в плазме применяли флюориметрический реагент, *o*-фталевый альдегид [28]. Определение концентрации общих и небелковых SH-групп в гомогенатах тимуса проводили с помощью флуоресцентного красителя ThioGlo-1 [29]. Активность СОД в эритроцитарной массе и супернатантах печени оценивали в системе генерации супероксидного радикала, который образуется в реакции восстановления молекулярного кислорода в присутствии феназинметасульфата и NADH [30]. ТБК-РП оценивали спектрофотометрическим методом, регистрируя базальный и  $\text{Fe}^{2+}$ /аскорбат-индуцированный уровни [31].

Под системой оксида азота мы подразумевали активность NOC и концентрацию стабильных метаболитов NO - нитратов и нитритов ( $\text{NO}_x$ ). Для определения  $\text{NO}_x$  применяли спектрофотометрический метод с использованием реактива Грисса. Предварительно восстанавливая нитраты в нитриты ферментативным способом с использованием нитратредуктазы (для печени) [32], или неферментативным способом с использованием хлорида ванадия (III) (для тимуса) [33]. Активность NOC определяли радиометрическим методом, предложенным Bredt и Snyder [34] по скорости накопления [ $^3\text{H}$ ]-L-цитруллин в реакции окисления [ $^3\text{H}$ ]-L-аргинина, катализируемой NOC.

Активность каспазы-3 определяли флуориметрическим методом Яковлева и соавт. с использованием флуорогенного субстрата каспазы-3 Ac-DEVD-AMC [35].

Содержание белка в пробах определяли по методу Bradford [36] с использованием красителя Кумасси голубого.

Статистическую обработку и анализ результатов проводили в программе "STATISTICA 6.0". Данные представлены в виде средней±ошибки средней. Для оценки достоверности различий использовали U-тест Манна-Уитни, а также t-тест Стьюдента. Корреляционный анализ проводили с использованием непараметрического  $\gamma$  критерия Спирмана.

**РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.** После отмены введения морфина у животных наблюдали выраженный спонтанный абстинентный синдром (рис. 1). Через 36 часов после последней инъекции морфина был выявлен практически весь спектр специфических для синдрома отмены признаков. В ходе эксперимента, а также через 12 часов после завершающей инъекции морфина заметных изменений массы животных зарегистрировано не было, однако, спустя 36 часов после окончания введения морфина обнаружено достоверное ( $p < 0,02$ , t-тест) снижение массы крыс. Так в контрольной группе масса животных составила  $308,4 \pm 8,8$  г, а в опытной группе  $282,3 \pm 9,9$  г. Также отмечено резкое (в 1,6 раза) достоверное ( $p < 0,001$ , t-тест) снижение массы тимуса с  $229,5 \pm 13,7$  мг в контрольной группе до  $145,2 \pm 9,0$  мг в опытной группе. Таким образом, из признаков синдрома отмены

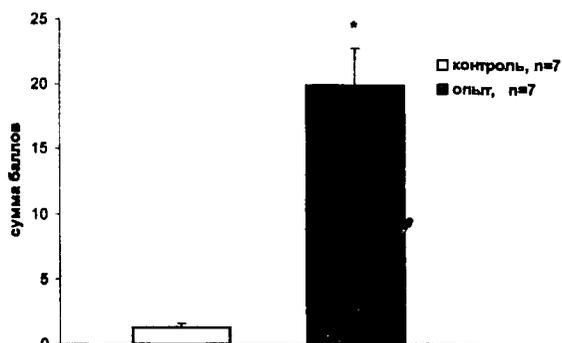


Рисунок 1.

Выраженность синдрома отмены морфина.

\* - достоверность различий от группы контроль при  $p < 0,002$  (U-тест Манна -Уитни)

животные не продемонстрировали только прыжковую активность, что может быть связано с тем, что данный признак более характерен для синдрома отмены, вызванного антагонистами опиатных рецепторов, таких как налоксон и налтрексон. Типичным признаком синдрома отмены морфина является снижение массы тела [37], основной причиной данного явления может быть стрессорное состояние в результате физической зависимости от морфина и гормонального дисбаланса [38].

В состоянии синдрома отмены достоверно повышается активность ферментов АСТ и ГГТП в сыворотке крови, при неизменной активности АЛТ, ГБДГ и КФК (табл. 1). Концентрация одного из компонентов антиоксидантной защиты крови - мочевой кислоты - достоверно не изменялась (в контрольной группе она составила  $61,7 \pm 8,2$  ммоль/л, а в опытной группе  $45,4 \pm 7,0$  ммоль/л).

Таблица 1. Активность ферментов в сыворотке крови крыс при синдроме отмены морфина.

Фермент	Активность, Ед/л	
	Контроль, (n=7)	Морфин, (n=7)
Аланинаминотрансфераза	$106,8 \pm 11,3$	$116,1 \pm 10,4$
Аспаратаминотрансфераза	$179,9 \pm 11,9$	$238,2 \pm 14,7$ *
Гаммаглутамилтранспептидаза	$4,0 \pm 0,9$	$16,8 \pm 3,3$ **
Креатинфосфокиназа	$6287,0 \pm 292,1$	$5987,7 \pm 318,2$
Гаммабутирилдегидрогеназа	$195,2 \pm 21,7$	$260,0 \pm 21,8$ #

Примечание: достоверность различий от контрольной группы (t-тест): \* -  $p < 0,02$ , \*\* -  $p < 0,005$ , # -  $p < 0,1$ 

Показатели свободнорадикального гомеостаза по-разному изменялись в исследуемых тканях. В плазме крыс изменений не обнаружено (табл. 2), однако, в печени синдром отмены морфина вызвал глубокие изменения показателей свободно-радикального гомеостаза (табл. 3). Так в опытной группе произошло снижение концентрации небелковых SH-групп, при этом концентрация общих SH-групп осталась неизменной. Отмена морфина приводит к значительному увеличению базального уровня ТБК-РП в печени, а также к снижению накопления ТБК-РП после индукции перекисного окисления (ПО) в  $Fe^{2+}$ /аскорбатной системе. Интенсивность индуцированного ПО в опытной группе положительно коррелировала с активностью  $Ca^{2+}$ -независимой NOC ( $r=0,82$ ,  $p < 0,05$ ). Активность СОД в печени не изменилась, однако, в контрольной группе животных отмечена корреляция ее активности с активностью  $Ca^{2+}$ -независимой изоформы NOC ( $r=0,96$ ,  $p < 0,0005$ ). В тимусе не произошло изменения концентрации небелковых и

### ОТМЕНА МОРФИНА И СВОБОДНОРАДИКАЛЬНЫЙ ГОМЕОСТАЗ

Таблица 2. Показатели свободнорадикального гомеостаза плазмы крови крыс при синдроме отмены морфина.

Показатель	Контроль, (n=7)	Морфин, (n=7)
Небелковые SH-группы, мкмоль/л	6,8±1,4	5,9±1,3
Общие SH-группы, мкмоль/л	113,8±20,4	140,4±23,4
ТБК-активные продукты, OD/мл	14,9±1,1	13,1±0,6
Активность СОД, Ед/мг Нб	32,6±1,3	34,0±2,4

Таблица 3. Показатели свободнорадикального гомеостаза печени крыс при синдроме отмены морфина.

Показатель	Контроль, (n=7)	Морфин, (n=7)
Небелковые SH-группы, мкмоль/г ткани	5,5±0,3	3,8±0,3 **
Общие SH-группы, мкмоль/г ткани	20,8±1,3	20,6±1,0
ТБК-активные продукты, OD/г ткани	47,0±2,5	73,8±11,6 *
Индукция ТБК-АП, %	1057±148	545±152 *
Активность СОД, Ед/мг белка/мин	38,2±0,4	39,4±0,8

Примечание: Достоверность различий от контрольной группы (t-тест): \* -  $p < 0,05$ , \*\* -  $p < 0,001$

общих SH-групп (табл. 4). Базальный уровень ТБК-ПП в тимусе снизился, а при индукции не изменился (табл. 4).

Таблица 4. Показатели свободнорадикального гомеостаза тимуса крыс при синдроме отмены морфина.

Показатель	Контроль, (n=7)	Морфин, (n=7)
Небелковые SH-группы, мкмоль/г ткани	4,5±0,6	2,5±0,2
Общие SH-группы, мкмоль/г ткани	101,1±4,7	98,3±5,5
ТБК-активные продукты, OD/г ткани	195,8±8,3	169,0±6,0 *
Индукция ТБК-АП, %	563,5±21,0	536,9±48,5

В плазме крови наблюдалось достоверное ( $p < 0,02$ , t-тест) снижение концентрации  $\text{NO}_x^-$  на треть (в контрольной группе  $18,3 \pm 2,1$  мкмоль/мл, в опытной  $12,1 \pm 0,6$  мкмоль/мл). В печени мы определяли как концентрацию  $\text{NO}_x^-$ , так и активность изоформ NOC ( $\text{Ca}^{2+}$ -зависимой и  $\text{Ca}^{2+}$ -независимой). Отмена морфина не повлияла на концентрацию  $\text{NO}_x^-$  в ткани печени, в контрольной группе данный показатель составил  $0,260 \pm 0,023$  нмоль/мг белка, а в опытной  $0,259 \pm 0,012$  нмоль/мг белка. Общая активность синтазы оксида азота ( $\text{Ca}^{2+}$ -зависимая и  $\text{Ca}^{2+}$ -независимая) не изменилась, однако, мы зарегистрировали перераспределение активностей изоформ NOC (рис. 2). Произошло достоверное снижение активности  $\text{Ca}^{2+}$ -независимой изоформы NOC ( $p < 0,02$ , t-тест) и повышение  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимой ( $p < 0,05$ , t-тест). Обнаружены следующие корреляции концентрации  $\text{NO}_x^-$  и активности изоформ NOC в печени при синдроме отмены морфина: концентрация  $\text{NO}_x^-$  образует положительную корреляцию с активностью  $\text{Ca}^{2+}$ -независимой изоформы ( $r = 0,89$ ,  $p < 0,01$ ) и отрицательную с активностью  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимой изоформы ( $r = -0,82$ ,  $p < 0,05$ ). В тимусе отмена морфина не повлияла на суммарную активность NOC: в опытной группе данный показатель составил  $0,355 \pm 0,031$  пмоль/мг /мин, а в контрольной -  $0,357 \pm 0,034$  пмоль/мг/мин. При этом концентрация  $\text{NO}_x^-$  достоверно увеличилась ( $p < 0,03$ , t-тест) с  $0,331 \pm 0,041$  пмоль/мг/мин в контрольной группе до  $0,511 \pm 0,052$  пмоль/мг/мин в опытной. В тимусе обнаружена прямая корреляция между активностью NOC и индуцированным накоплением ТБК-ПП, как в опытной группе ( $r = 0,7$ ,  $p < 0,005$ ), так и при объединении значений в опытной и контрольной группе в единый массив

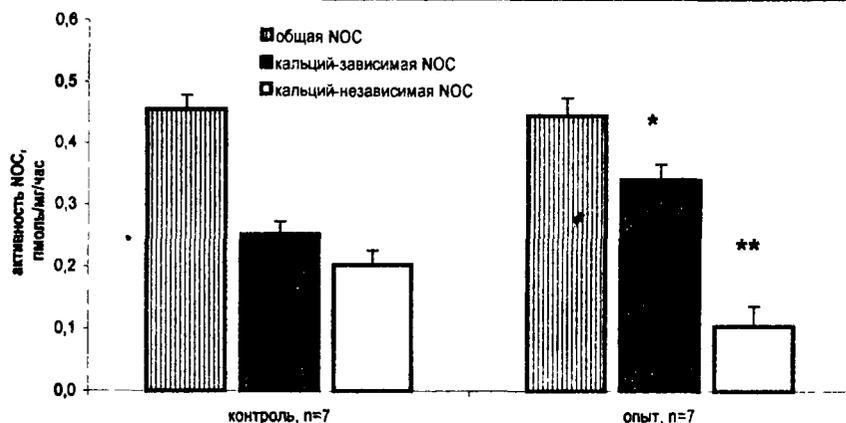


Рисунок 2.

Активность изоформ NOS при синдроме отмены морфина в печени крыс.

Достоверность различий между контрольной и опытной группами (t-тест): \* -  $p < 0,05$ , \*\* -  $p < 0,02$

( $r = 0,9$ ,  $p < 0,01$ ). Более того, при объединении значений контрольной и опытной группы в единый массив наблюдается обратная корреляция между базальным уровнем ТБК-РП и концентрацией NOx ( $r = -0,75$ ,  $p < 0,01$ ).

Активность каспазы-3 в период отмены морфина в печени ( $38,7 \pm 12,0$  пмоль/мг/мин в контрольной группе и  $26,9 \pm 5,3$  пмоль/мг/мин в опытной), также как и в тимусе ( $75,7 \pm 25,8$  пмоль/мг/мин в контрольной группе и  $97,6 \pm 19,3$  пмоль/мг/мин в опытной) статистически достоверно не изменилась. Однако, корреляционный анализ показал, что в печени животных опытной группы существует обратная корреляция между активностью Ca<sup>2+</sup>-зависимой NOS и активностью каспазы-3 ( $r = -0,83$ , при  $p < 0,05$ ).

Известно, что отмена морфина сопряжена с биохимическими изменениями в соматических органах, в частности, в печени и тимусе. В печени происходит активный метаболизм ксенобиотиков, включая морфин [39], с образованием продуктов, которые прямо или косвенно участвуют в токсическом повреждении ткани за счет активации свободнорадикальных процессов [39]. Развитие окислительного стресса в печени под действием хронического введения морфина достаточно полно охарактеризовано в экспериментах как *in vivo*, так и *in vitro* [1, 4, 39, 40]. В нашей работе показано, что при отмене морфина наблюдается снижение уровня небелковых SH-групп (глутатиона), увеличение базального уровня ТБК-РП, снижение интенсивности накопления ТБК-РП в Fe<sup>2+</sup>/аскорбатной индуцирующей системе. Изменений активности СОД мы не зарегистрировали, что, возможно, связано с вовлечением в нейтрализацию свободных радикалов других антиоксидантных ферментативных систем, например, каталазы. Таким образом, развитие окислительного стресса характерно как для хронического введения морфина, так и для синдрома отмены. Интенсификация свободнорадикальных процессов приводит к повреждению клеточных мембран клеток печени, которому сопутствует массивный выход органоспецифических ферментов (АСТ, АЛТ, ГГТП) в кровяное русло [5]. В данном эксперименте мы зафиксировали повышение активности только АСТ и ГГТП в плазме, что может быть связано с различным временем полувыведения разных ферментов. Несмотря на то, что ранее было показано, что хроническое введение морфина приводит к уменьшению содержания в плазме крови витамина Е, аскорбиновой кислоты и сульфгидрильных групп и увеличения концентрации перекисей липидов [3], на использованной в эксперименте модели мы не зафиксировали признаков активации свободнорадикальных процессов в крови. Это может быть связано с использованием различных экспериментальных условий.

### ОТМЕНА МОРФИНА И СВОБОДНОРАДИКАЛЬНЫЙ ГОМЕОСТАЗ

Известно, что NO проявляет свойства как антиоксиданта, так и прооксиданта. Так, прямое взаимодействие NO со свободными радикалами липидов приводит к образованию стабильных комплексов и невозможности дальнейшего развития ПОЛ [41]. С другой стороны, NO, вступая в реакцию с супероксидом, образует токсичный пероксинитрит, который может распадаться с образованием индуктора перекисных процессов - гидроксильного радикала [42]. Оценки роли оксида азота при окислительном стрессе, вызванном хроническим введением опиатов, до сих пор не было проведено.

Согласно современным представлениям, в норме в печени отсутствует  $Ca^{2+}$ -независимая изоформа NOS, и ее активация происходит только при воздействии эндотоксинов и/или провоспалительных цитокинов [43], однако, в ряде работ продемонстрировано наличие данной изоформы у животных контрольных групп [44, 45]. Мы зарегистрировали снижение концентрации  $NO_x^-$  в плазме при синдроме отмены. Можно предположить, что концентрация метаболитов NO в плазме зависит от активности именно  $Ca^{2+}$ -независимой изоформы в печени, которая также снижена. В связи с обнаружением в печени животных опытной группы прямой корреляции концентрации  $NO_x^-$  с активностью  $Ca^{2+}$ -независимой NOS и обратной корреляции с активностью  $Ca^{2+}$ -зависимой изоформы, можно предположить, что накопление  $NO_x^-$  в печени в данных условиях в большей степени зависит от активности  $Ca^{2+}$ -независимой NOS. Следует отметить, что в контрольной группе животных подобных корреляций обнаружено не было. Ранее было показано, что при введении производных морфина (героина и морфин-6-глюкуронида) после введения ЛПС обнаруживается снижение содержания иNOS и её мРНК [13, 14]. Поскольку  $Ca^{2+}$ -зависимая NOS или иNOS является важным элементом неспецифической иммунной защиты, снижение активности  $Ca^{2+}$ -независимой NOS, вероятно, связано со снижением иммунологических показателей. Возможной причиной снижения активности иNOS может быть прямое воздействие морфина на иммунциты печени (в первую очередь, на купферовские клетки), на поверхности которых экспрессируются опиатные рецепторы [14]. Морфин также может опосредованно влиять на иммунологические показатели через активацию вегетативной нервной системы и гипоталамо-гипофизарно-адреналовой оси [14]. Повышение активности  $Ca^{2+}$ -зависимой NOS, скорее всего, имеет адаптивный характер и направлено на интенсификацию микроциркуляции в ткани в состоянии массивированной токсической атаки морфина. Обнаружение прямой корреляции между активностью  $Ca^{2+}$ -независимой NOS и активностью СОД в контрольной группе, а также между  $Ca^{2+}$ -независимой NOS и накоплением ТБК-РП в процессе индукции в опытной группе дает основание предполагать, что NO в печени может функционировать как антиоксидант.

Известно, что окислительный стресс может выступать в роли инициатора апоптотического каскада [46, 47], который может быть одной из причин разрушения ткани печени в условиях хронической морфинизации. Несмотря на развитие выраженного окислительного стресса в печени, заметного изменения активности каспазы-3 не происходит. Видимо, в данных условиях не происходит зависимо от активности каспаз апоптоза. Так, для печени показана возможность развития апоптоза, функционально не связанного с активацией каспаз [48]. Исходя из наличия достоверной обратной корреляции между активностями  $Ca^{2+}$ -зависимой NOS и каспазы-3 в печени животных опытной группы, можно предположить, что именно оксид азота предотвращает развитие апоптоза. Известно, что NO способен взаимодействовать с SH-группами активного центра каспазы-3, в результате чего происходит инактивация фермента и блокирование протеолитической активности каспаз [11]. С другой стороны, на митохондриях клеток печени показано, что NO может предотвращать апоптоз за счет уменьшения проницаемости пор на мембране митохондрий, тем самым препятствуя выходу цитохрома c в цитоплазму [49].

Таким образом, согласно результатам проведенного эксперимента, при отмене морфина NO, по-видимому, выполняет защитную роль, по крайней мере, в печени. Во-первых, насколько позволяют судить обнаруженные корреляции, NO выполняет антиоксидантную роль в условиях развития окислительного стресса под действием морфина, хотя и не предотвращает его полностью. Во-вторых, можно предположить антиапоптотическую роль оксида азота в печени, однако, этот вопрос требует дальнейших исследований.

Снижение массы тимуса в период синдрома отмены морфина является типичным признаком и связано с резким снижением числа тимоцитов. Природа данного явления не ясна, но известно, что снижение массы тимуса - процесс опосредованный  $\mu$ -опиатными рецепторами [50].

Характерных для печени изменений свободнорадикального гомеостаза в тимусе мы не обнаружили. Более того, в тимусе происходит неожиданное снижение базального уровня ТБК-РП. Повреждающее действие морфина на тимус, видимо, не связано с окислительным стрессом. Изменения активности NOC в тимусе не было зарегистрировано, однако, концентрация  $\text{NO}_x^-$  после отмены морфина была существенно повышена. Возможно, это связано с нарушением выведения нитратов и нитритов из ткани. Можно предположить, что в тимусе NO препятствует развитию окислительного стресса, вызванного отменой морфина. Для такого предположения дают основание прямые корреляции между активностью NOC и накоплением ТБК-РП в процессе индукции, как в опытной группе, так и при объединении значений опытной и контрольной группы в единый массив. Кроме того, на наш взгляд, наличие обратной корреляции между базальным уровнем ТБК-РП и концентрацией  $\text{NO}_x^-$  в опытной группе подтверждает антиоксидантные свойства оксида азота в тимусе при синдроме отмены морфина. Ранее в экспериментах *in vivo* было показано, что морфин вызывает апоптоз в тимоцитах, показанный как морфологически [23], так и по фрагментации ДНК [51]. В нашей работе не зарегистрированы изменения активности каспазы-3; по-видимому, апоптоз либо вообще не представлен в тимусе, либо происходит по независимому от активации каспазы-3 пути. Таким образом, мы показали, что при отмене морфина развивается ярко выраженный окислительный стресс в печени, но не в тимусе. NO при данных условиях, по-видимому, выполняет антиоксидантную роль в тимусе и печени.

**ВЫВОДЫ.** 1. Синдром отмены морфина у крыс сопровождается выраженным окислительным стрессом в печени.

2. Активность  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимой изоформы NOC в печени повышается, а  $\text{Ca}^{2+}$ -независимой NOC - снижается, при этом общая активность NOC в печени остается неизменной.

3. Синдром отмены морфина не влияет на показатели свободнорадикального окисления и активность NOC в тимусе.

4. При синдроме отмены морфина происходит снижение концентрации нитратов/нитритов в крови и повышение в тимусе.

5. Отмена морфина не вызвала изменений активности ключевого фермента апоптоза, каспазы-3, в исследованных органах.

Работа выполнена при поддержке грантов РГНФ (№ 03-06-00146а), РФФИ (№ 02-04-49452) и гранта федеральной целевой программы "Интеграция науки и высшего образования России на 2002-2006 г. (№ И 0566).

ЛИТЕРАТУРА

1. Константинопольский М.А., Пирожков С.В., Соловьева А.Г., Панченко Л.Ф., Барков Н.К. (1992) Эксперим. и клин. фармакол., **55**, 21-24.
2. Skoulis N.P., James R.C., Harbison R.D., Roberts S.M. (1989) Toxicology, **57**, 287-302.
3. Панченко Л.Ф., Пирожков С.В., Соловьева А.Г. (1995) Вопр. наркологии, № 2, 32-36.
4. Sumathy T., Subramanian S., Govindasamy S., Balakrishna K., Veluchamy G. (2001) Phytother. Res., **15**, 643-645.
5. Needham W.P., Shuster L., Kanel G.C., Thompson M.L. (1981) Toxicol. Appl. Pharmacol., **58**, 157-170.
6. Tubaro E., Borelli G., Crose C., Cavallo G., Santiangeli C. (1983) J. Infect. Dis., **148**, 656-666.
7. Bryant H.U., Bernton E.W., Holaday J.W. (1987) Life Sci., **41**, 1731-1738.
8. Shavit Y., Lewis J.W., Terman G.W., Gale R.P., Liebeskind J.C. (1984) Science, **223**, 188-190.
9. Weber R.J., Ikejiri B., Rice K.C., Pert A., Hagan A.A. (1987) NIDA Res. Monogr., **76**, 341-348.
10. Moncada S., Palmer R.M.J., Higgs E.A. (1991) Pharmacol. Rev. **43**, 109-142.
11. Li J., Billiar T.R. (1999) Am. J. Physiol., **276**, G1069-G1073.
12. Bogdan C. (2001) Nature Immunol., **2**, 907-916.
13. Lysle D.T., Carrigan K.A. (2001) Inflammation, **25**, 267-275.
14. Lysle D.T., How T. (2000) Immunopharmacology, **46**, 181-192.
15. Kim P.K., Zamora R., Petrosko P., Billiar T.R. (2001) Int. Immunopharmacol., **1**, 1421-1441.
16. Raff M. C. (1992) Nature, **356**, 397-400.
17. Meier P., Finch A., Evan G. (2000) Nature, **407**, 796-801.
18. Thompson C. B. (1995) Science, **267**, 1456-1462.
19. Grutter M. G. (2000) Curr. Opin. Struct. Biol., **10**, 649-655.
20. Nicholson D. W. (1999) Cell Death Differ., **6**, 1028-1042.
21. Kanzler S., Galle P.R. (2000) Semin. Cancer Biol., **10**, 173-184.
22. Fesus L., Davies P.J., Piacentini M. (1991) Eur. J. Cell Biol., **56**, 170-177.
23. Zhang Y., Wu G.C., He Q.Z., Cao X.D. (2000) Acupunct. Electrother. Res., **25**, 17-26.
24. Rahman S, Ali Khan R, Kumar A. (2002) BMC Complement. Altern. Med., **2**, 6
25. Dum J, Blasig J, Herz A. (1981) Eur. J. Pharmacol., **70**, 293-300.
26. Blasig J, Herz A, Reinhold K, Zieglgansberger S. (1973) Psychopharmacologia (Berl.), **33**, 19-38.
27. Sedlak S., Lindsay R.M. (1968) Anal. Biochem., **25**, 192-205.
28. Hu M.L. (1994) Methods in Enzymology, **233**, 380-385.
29. Яковлев А.А., Гуляева Н.В. (2003) Биомедицинская химия, **50**, 390-397
30. Nishikimi M., Rao N.A., Yagi K. (1972) Biochem. Biophys. Res. Commun., **46**, 849-855.
31. Казан В.Е., Прилипко Л.Л., Савов В.М. и соавт. (1979) Биохимия, **44**, 379-385.
32. Grisham M.B., Johnson G.G., Lancaster J.R. Jr. (1996) Meth. Enzymol., **268**, 237-246.
33. Miranda K.M., Espey M.G., Wink D.A. (2001) Nitric Oxide, **5**, 62-71.
34. Bredt D.S., Snyder S.H. (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **86**, 9030-9033.
35. Яковлев А.А., Онуфриев М.В., Степаничев М.Ю. и др. (2001) Нейрохимия, **18**, 41-43.
36. Bradford M.M. (1976) Anal. Biochem., **72**, 248-254.
37. Stolerman I.P., Johnson C.A., Bunker P., Jarvik M.E. (1975) Psychopharmacologia, **45**, 157-161.
38. Houshyar H., Cooper Z.D., Woods J.H. (2001) J. Neuroendocrinol., **13**, 862-874.

39. William S., Sekar N., Subramanian S., Govindasamy S. (1991) *Biochem. Int.*, **23**, 1071-1077.
40. Yamano S., Kageura E., Ishida T., Toki S. (1985) *J. Biol. Chem.*, **260**, 5259-5264.
41. Rubbo H., Radi R., Trujillo M., Telleri R., Kalyanaraman B., Barnes S., Kirk M., Freeman B.A. (1994) *J. Biol. Chem.*, **269**, 26066-26075.
42. Beckman J.S., Koppenol W.H. (1996) *Am. J. Physiol.*, **271**, C1424-C1437.
43. Taylor B.S., Alarcon L.H., Billiar T.R. (1998) *Биохимия*, **63**, 766-781.
44. Heller J., Sogni P., Barriere E., Tazi K.A., Chauvelot-Moachon L., Guimont M.-C., Bories P.N., Poirel O., Mareau R., Lebrech D. (2000) *J. Hepatol.*, **33**, 376-381.
45. Zhu W., Fung P.C.W. (2000) *Free Rad. Biol. Med.*, **29**, 870-880.
46. Green D.R., Reed J.C. (1998) *Science*, **281**, 1309-1312.
47. Herrera B., Alvarez A.M., Sanchez A., Fernandez M., Roncero C., Benito M., Fabregat I. (2001) *FASEB J.*, **15**, 741-751.
48. Selmana C., Kendaiaha S., Gredillab R., Leeuwenburgha C. (2003) *Exp. Gerontol.*, **38**, 897-903.
49. Brookes P.S., Salinas E.P., Darley-Usmar K., Eiserich J.P., Freeman B.A., Darley-Usmar V.M., Anderson P.G. (2000) *J. Biol. Chem.*, **275**, 20474-20479.
50. Gaveriaux-Ruff C., Matthes H.W., Peluso J., Kieffer B.L. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **95**, 6326-6330.
51. Fuchs B.A., Pruett S.B. (1993) *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **266**, 417-423.

Поступила 13.11.2003.

#### EFFECTS OF MORPHINE WITHDRAWAL ON THE INDICES OF FREE RADICAL HOMEOSTASIS AND NITRIC OXIDE SYSTEM IN RAT LIVER AND THYMUS

L.F. Panchenko<sup>1</sup>, D.I. Peregud<sup>1</sup>, A.A. Yakovlev<sup>2,3</sup>, M.V. Onufriev<sup>2</sup>, M.Y. Stepanichev<sup>2</sup>,  
N.A. Lazareva<sup>2</sup>, T.V. Pavlova<sup>2</sup>, V.Y. Baronets<sup>1</sup>, N.V. Gulyaeva<sup>2</sup>

<sup>1</sup>National Scientific Center of Addiction, Ministry of Healthcare of RF, M. Mogiltsevskij per., 3, Moscow, 119002, Russia, tel./fax +7 (095) 2419590, e-mail: biochn@mail.ru

<sup>2</sup>Institute of Higher Nervous Activity and Neurophysiology RAS, Moscow, Russia

<sup>3</sup>Moscow Institute of Physics and Technology, Moscow region, Russia

Indices of oxidative stress, nitric oxide (NO) metabolism as well as the activity of caspase-3, an important enzyme of apoptotic cell death, were measured during the morphine withdrawal syndrome in liver and thymus of rats. Male Wistar rats were administered with morphine hydrochloride (i.p., at increasing doses from 10 to 100 mg/kg, twice a day, for 6 days). Thirty-six hours after the last administration the withdrawal syndrome was monitored using the specific autonomic and locomotor indices. During this period, weights of body and thymus significantly decreased. Oxidative stress in liver was accompanied by an increase in aspartate aminotransferase and gamma-glutamyl transferase in blood serum. No signs of oxidative stress could be demonstrated in thymus. The activity of the Ca<sup>2+</sup>-dependent isoform of nitric oxide synthase (NOS) in liver increased, while, the activity of the Ca<sup>2+</sup>-independent NOS diminished, the total activity of NOS in liver and thymus remained unchanged. The concentration of nitrates/nitrites in blood was decreased, in thymus increased, and in liver unchanged. Caspase-3 activity changed neither in liver, nor in thymus. The results are discussed from the perspective of possible antioxidant and antiapoptotic role of NO during morphine withdrawal syndrome.

**Key words:** morphine withdrawal syndrome, oxidative stress, nitric oxide, caspase-3, liver, thymus