

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

УДК 615.015.6+612.82

©Коллектив авторов

АКТИВНОСТЬ СИНТАЗЫ ОКСИДА АЗОТА И КОНЦЕНТРАЦИЯ НИТРАТОВ/НИТРИТОВ В ОТДЕЛАХ ГОЛОВНОГО МОЗГА КРЫС ПРИ СПОНТАННОМ СИНДРОМЕ ОТМЕНЫ МОРФИНА

*Д.И. Перегуд¹, М.В. Онуфриев², А.А. Яковлев^{2,3}, М.Ю. Степаничев²,
Н.А. Лазарева², Т.В. Павлова², Л.Ф. Панченко¹, Н.В. Гуляева²*

¹Национальный научный центр наркологии МЗ РФ, 119002 Москва,
Мал. Могильцевский пер., 3, тел./факс: (495) 2419590; эл. почта: biochn@mail.ru

²Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН, Москва

³Московский физико-технический институт, Долгопрудный, Московская область

Исследовали активность синтазы оксида азота (NOC) и концентрацию нитратов/нитритов (NO_x^-) в отделах головного мозга при спонтанном синдроме отмены морфина. Синдром отмены моделировали на крысах-самцах Wistar введением раствора морфина гидрохлорида внутривенно в течение 6 дней дважды в сутки в возрастающих дозах (10 - 100 мг/кг). Через 36 часов после последней инъекции препарата по специфическим вегетативным и двигательным признакам установили выраженный спонтанный синдром отмены морфина. При этом активность NOC, а также концентрация NO_x^- увеличились в среднем мозге и гиппокампе, снизились в стриатуме и гипоталамусе и остались неизменными в коре больших полушарий и стволе мозга. Концентрация NO_x^- в мозжечке не изменилась, однако при этом активность NOC снизилась. Активность NOC и концентрация NO_x^- в коре, стриатуме, среднем мозге и мозжечке коррелировали как с интенсивностью синдрома отмены, так и с выраженностью специфических признаков абстиненции.

Ключевые слова: спонтанный синдром отмены морфина, оксид азота, синтаза оксида азота, концентрация нитратов/нитритов, мозг, крысы.

ВВЕДЕНИЕ. Во всем мире немедицинское использование препаратов опиоидной группы (героин, морфин) приобретает эпидемический характер. При хроническом введении препаратов опиоидной группы развивается физическая зависимость. Формирование физической зависимости характеризуется абстинентным синдромом (синдромом отмены, СО), который представляет собой симптоматический комплекс, возникающий при отмене препарата, и включает в себя вегетативно-соматические и неврологические расстройства [1].

При хроническом введении опиатов/опиоидов, а также при синдроме отмены наблюдаются глубокие изменения нейрохимического гомеостаза, затрагивающие как субклеточный, так и клеточный уровни организации. Хроническое потребление морфина и его производных сопряжено с изменением экспрессии генов и транскрипционных факторов [2], изменением активности ферментов, системы вторичных посредников, и функционированием ионных каналов и рецепторов [3]. Известно, что при СО изменяется метаболизм ряда

нейромедиаторов и процессы синаптической передачи, опосредуемой этими нейромедиаторами [4]. При данном состоянии изменяются процессы синаптической пластичности [5] и нейрогенеза [6].

В последние пятнадцать лет огромный интерес у исследователей вызывает оксид азота (NO), который является медиатором большого числа физиологических и патологических процессов. Эндогенным предшественником NO является аминокислота L-аргинин. Реакцию образования NO из L-аргинина катализирует фермент синтаза оксида азота (NOC), который представлен тремя изоформами: кальций-зависимыми нейрональной (nNOC) и эндотелиальной (eNOC), а также кальций-независимой индуцибельной (iNOC) [7]. NO является внутри- и межклеточным посредником в центральной и периферической нервной системе [8]. В экспериментальной наркологии NO уделяется особое внимание. Известно, что NO вовлечен в процессы, сопряженные с наркотической зависимостью от опиатов/опиоидов, включая положительное подкрепление [9], вызываемое препаратами данной группы, толерантность [10], физическую зависимость и СО [11]. Индуцированная отмена героина (введение антагониста опиоидных рецепторов налоксона) сопровождается увеличением числа клеток, содержащих NADPH-диафорузу (гистохимический маркер NOC) в ядрах шва [12]. Показано, что индуцированный налоксоном СО морфина сопровождается увеличением числа nNOC-позитивных клеток в гипоталамусе и голубом пятне [13]. Тем не менее, до сих пор проведено сравнительно небольшое число исследований биохимических показателей системы оксида азота, таких как активность NOC и концентрации стабильных метаболитов NO – нитратов и нитритов (NO_x^-) при опином СО, причем результаты этих работ достаточно противоречивы. Так, показано, что в целом мозге и в цереброспинальной жидкости крыс в состоянии опиной абстиненции увеличивается концентрация NO_x^- [14]. В работах [13, 15, 16] указывается на увеличение активности кальций-зависимой NOC в мозжечке при абстиненции, хотя активность NOC остается неизменной в переднем мозге и фронтальной коре [13]. С другой стороны в работе [17] показано увеличение активности NOC в переднем мозге и таламусе при опиной абстиненции. Ряд данных свидетельствует о том, что СО препаратов опиной группы не сопровождается изменением активности NOC в отделах мозга. Так, при отмене морфина активность NOC не изменялась в мозжечке, среднем мозге и коре [18], а хроническая морфинизация не изменяла ни активность NOC, ни содержание ее мРНК в мозжечке и стволе мозга [19]. Следует отметить, что основным биохимическим показателем, исследованным в указанных выше работах, является активность NOC в отделах мозга. Концентрацию стабильных метаболитов NO определяли только в единственной работе и как самостоятельный показатель [14].

В нашей работе планировалось параллельное определение активности NOC и концентрации NO_x^- при опином абстинентном синдроме. В отличие от выполненных ранее работ [13-17], в которых исследовали индуцированный антагонистами опиоидных рецепторов СО, мы определяли спонтанную абстиненцию, возникающую после прекращения введения препарата. Мы также постарались оценить метаболизм NO в достаточно большом числе отделов мозга (в отличие от выполненных ранее работ, в которых исследовали единичные структуры). Таким образом, целью настоящего исследования явилось определение активности NOC и концентрации NO_x^- в отделах мозга крыс при спонтанном СО морфина.

МЕТОДИКА. В работе использовали 14 крыс-самцов Wistar массой 250-350 г в возрасте 6 мес. Животных содержали по 4-5 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 модифицированной схеме [20, 21]

в течение 6 дней два раза в сутки (в 10.00 и 20.00) в возрастающих дозах 10-100 мг/кг (табл. 1). Спонтанный СО оценивали через 36 часов после завершающей дозы морфина в “открытом поле” (арена диаметром 120 см и высотой стенок 40 см). Выраженность СО оценивали в течение 5 мин по ряду специфических двигательных (отряхивания по типу мокрой собаки, прыжковая активность, корчи, жевание, скрип зубами, встряхивание передними лапами) и вегетативных (диарея, птоз, ринорея, пилоэрекция, диспноэ, писк при дотрагивании, агрессивность) признаков [20, 22]. Если было возможно, наблюдаемые признаки регистрировали количественно с дальнейшим присвоением каждому признаку балла, зависящего от специфичности признака (табл. 2). Выраженность СО представляли в виде суммы баллов. Также каждый день измеряли массу крыс. Животных обеих групп декапитировали сразу после оценки СО морфина и на холоду выделяли из мозга следующие структуры: кору больших полушарий, стриатум, гиппокамп, гипоталамус, средний мозг, мозжечок и ствол мозга, после чего замораживали в жидком азоте. До исследования образцы хранили при – 30°C.

Таблица 1. Схема эксперимента.

День	Время	Доза морфина (мг/кг, в/б)
1	10.00	10
	20.00	10
2	10.00	20
	20.00	20
3	10.00	40
	20.00	40
4	10.00	60
	20.00	60
5	10.00	80
	20.00	80
6	10.00	100
	20.00	100
7		отмена морфина
8	8.00	оценка синдрома отмены

Таблица 2. Шкала оценки синдрома отмены морфина у животных [20] .

Специфические признаки абстиненции	Балл
отряхивания по типу мокрой собаки	2
прыжковая активность	2
корчи	2
жевание	2
скрип зубами	2
встряхивания передними лапами	2
писк при дотрагивании	1
диарея	1
птоз	2
ринорея	3
пилоэрекция	2
диспноэ	2
агрессивность	1

Отделы мозга гомогенизировали в гомогенизаторе типа Potter S в течение 1 мин при 1500 об/мин в 5 объемах 20 мМ HEPES (pH 7,5) при 4°C. Часть гомогенатов аликвотировали для определения сульфгидрильных групп (SH-групп) и продуктов, реагирующих с тиобарбитуровой кислотой (ТБК-РП). Оставшуюся часть гомогенатов центрифугировали 30 мин при 14000 g при 4°C, часть полученных супернатантов отбирали для определения нитратов и нитритов (NO_x^-) и активности супероксиддисмутазы (СОД). В оставшуюся часть супернатанта добавляли охлажденный 20 мМ HEPES (pH 7,5) (в соотношении 1:1), содержащий 1 мМ этилендиаминтетраацетата (ЭДТА), 2 мМ дитиотреитол (ДТТ), 2 мМ фенолметилсульфонилфторид (ФМСФ), апротинин и лейпептин в концентрации по 10 мкг/мл и распределяли для определения активности ферментов NOC и каспазы-3.

Концентрацию NO_x^- определяли по интенсивности флуоресценции 2,3-диаминонафтотриазола, продукта реакции 2,3-диаминонафталина (ДАН) и нитрита в кислой среде [23]. Активность NOC определяли радиометрическим методом [24] по скорости накопления [^3H]-L-цитруллина в реакции окисления [^3H]-L-аргинина, катализируемой NOC.

Для исследования свободнорадикального гомеостаза мы использовали следующие показатели: концентрация сульфгидрильных групп (небелковых и общих) и ТБК-РП, а также активность СОД. Определение концентрации общих и небелковых SH-групп в гомогенатах отделов мозга проводили с помощью флуоресцентного красителя ThioGlo-1 [25]. ТБК-РП оценивали спектрофотометрическим методом, регистрируя базальный и Fe^{2+} /аскорбат-индуцированный уровни [26]. Активность СОД в супернатантах мозга оценивали в системе генерации супероксидного радикала, который образуется в реакции восстановления молекулярного кислорода в присутствии феназинметасульфата и NADH [27].

Дополнительно к оценке системы NO, в супернатантах определяли активность каспазы-3 флуориметрическим методом с использованием флуорогенного субстрата каспазы-3 Ac-DEVD-AMC [28].

Содержание белка в пробах определяли по методу Bradford [29] с использованием красителя Кумасси голубого.

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

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ. Через 36 часов после завершающей инъекции морфина животные проявили ярко выраженный (достоверно отличающийся от контрольной группы $p < 0,002$, U-тест) СО. Интенсивность отмены, представленная в виде суммы баллов, в контрольной группе составила $1,29 \pm 0,29$, а в опытной $19,86 \pm 2,87$. На момент тестирования был выявлен практически весь спектр специфических для синдрома отмены признаков (рис. 1). Выраженность следующих двигательных признаков, продемонстрированных животными опытной группы, достоверно (U-тест Манна-Уитни) отличалась от контроля: отряхивания по типу мокрой собаки ($p < 0,002$), встряхивание передними лапами ($p < 0,05$), жевание ($p < 0,05$). Также достоверно отличалась от контроля выраженность вегетативных признаков ($p < 0,03$), таких как диарея, птоз, диспноэ и писк при дотрагивании. Достоверных различий по выраженности корч, скрипа зубами, ринореи, пилоэрекции и агрессивного поведения выявлено не было.

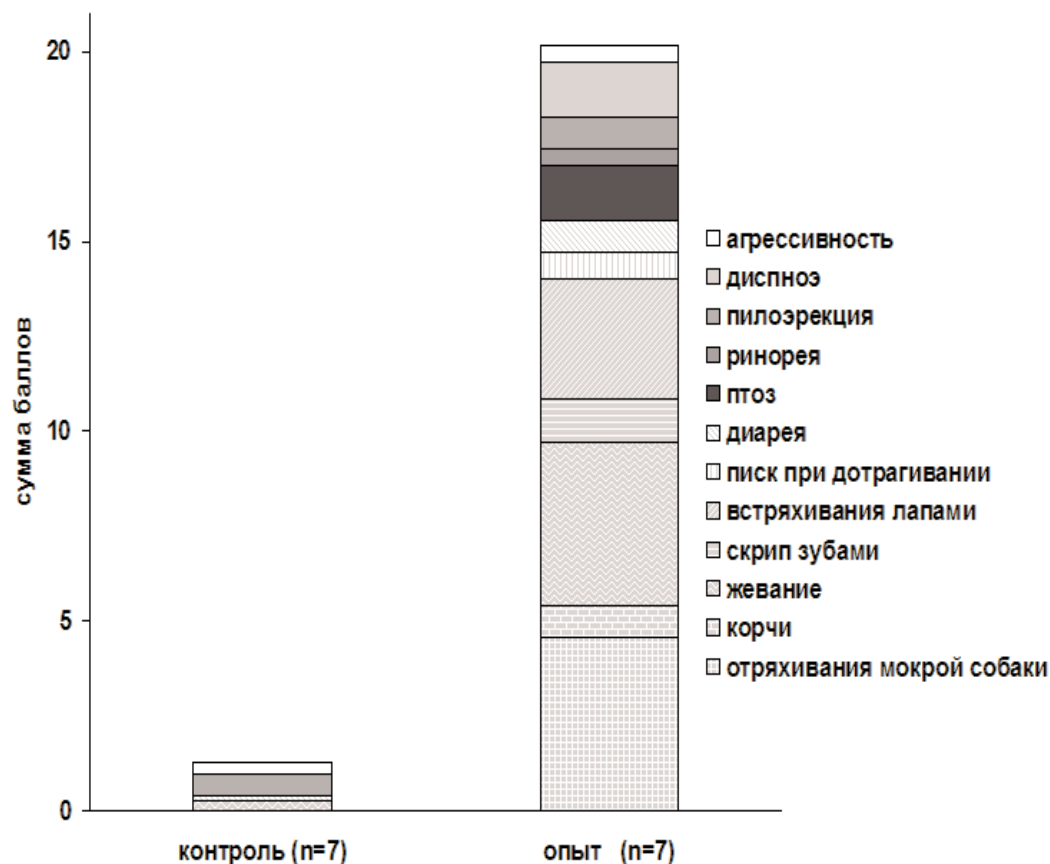


Рисунок 1.
Структура синдрома отмены морфина.

Кроме этого, было выявлено достоверное увеличение (по критерию Хи-квадрат) частоты встречаемости признаков в опытной группе по сравнению с контрольной как по двигательным, так и по вегетативным признакам (табл. 2). Для двигательных признаков: отряхивания по типу “мокрой собаки” ($p < 0,002$), встряхивания передними лапами ($p < 0,02$), жевание ($p < 0,05$). Для вегетативных признаков ($p < 0,01$): диарея, птоз, диспноэ и писк при дотрагивании. Для корч, скрипа зубами, ринореи, пилоэрекции и агрессивного поведения достоверных различий между группами по частоте встречаемости, так же, как и для выраженности признака, выявлено не было.

В ходе эксперимента, а также через 12 часов после отмены введения морфина заметных изменений массы животных зарегистрировано не было. Однако, спустя 36 часов после окончания введения морфина обнаружено достоверное (t-тест Стьюдента, $p < 0,02$) снижение массы крыс в опытной группе ($282,3 \pm 9,9$ г по сравнению с $308,4 \pm 8,8$ г в контрольной группе).

СО вызвал неоднозначные изменения метаболизма оксида азота в отделах мозга. Изменение активности NOC и концентрации NO_x^- во всех отделах мозга, за исключением мозжечка, имело однонаправленный характер, хотя достоверной корреляции между данными показателями обнаружено не было. Лишь в среднем мозге при объединении значений контрольной и опытной группы в единый массив ($n=14$) наблюдалась положительная корреляция между данными показателями ($r=0,74$, $p < 0,005$).

NO СИНТАЗА МОЗГА ПРИ ОТМЕНЕ МОРФИНА

Активность NOC, а также концентрация NO_x^- статистически достоверно (t-тест) увеличились в среднем мозге и гиппокампе, снизились в стриатуме и гипоталамусе и остались неизменными в коре больших полушарий и стволе мозга (рис. 2, 3). Концентрация NO_x^- в мозжечке не изменилась, хотя активность NOC снизилась (рис. 2, 3). При анализе данных (значения показателей опытной и контрольной групп объединены в единый массив, $n=14$) выявлено наличие статистически достоверных корреляций между показателями метаболизма NO и выраженностью опийного CO, а также отдельными признаками CO. Как активность NOC, так и концентрация NO_x^- в коре больших полушарий, стриатуме и среднем мозге коррелировали с суммой баллов CO, в то время как в мозжечке такая корреляция обнаружена только для активности NOC (табл. 3). И активность NOC, и концентрация NO_x^- в среднем мозге коррелировали с выраженностью отряхиваний по типу мокрой собаки, при этом только активность NOC в мозжечке и стриатуме и только концентрация NO_x^- в коре коррелировали с данным признаком CO (табл. 4). Обнаружены корреляции активности NOC и концентрации NO_x^- с выраженностью встряхиваний передними лапами в стриатуме (для активности NOC в коре больших полушарий, а для концентрации NO_x^- - в среднем мозге) (табл. 5).

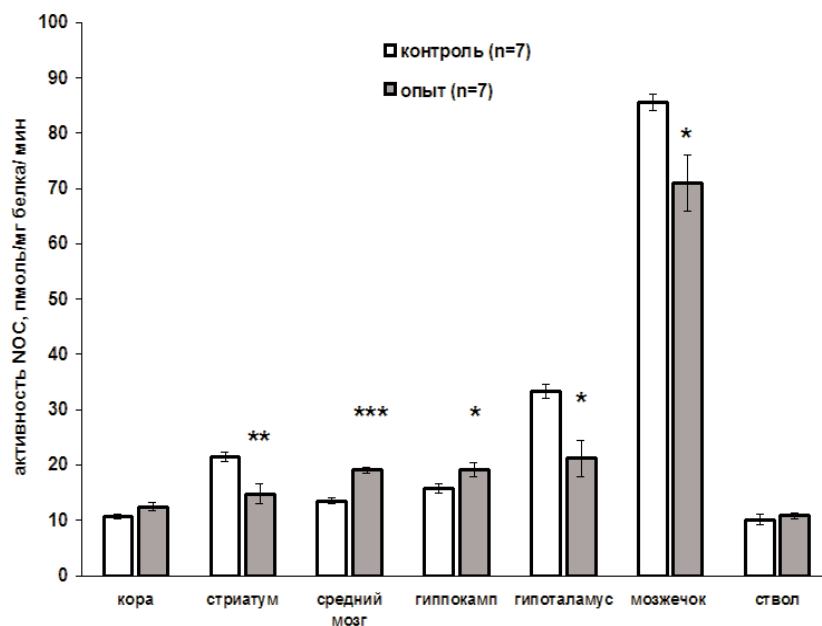


Рисунок 2.

Активность NOC в отделах мозга при синдроме отмены морфина.

* - достоверность различий (t-тест) от контрольной группы $p < 0,05$, ** - $p < 0,005$, *** - $p < 0,00001$.

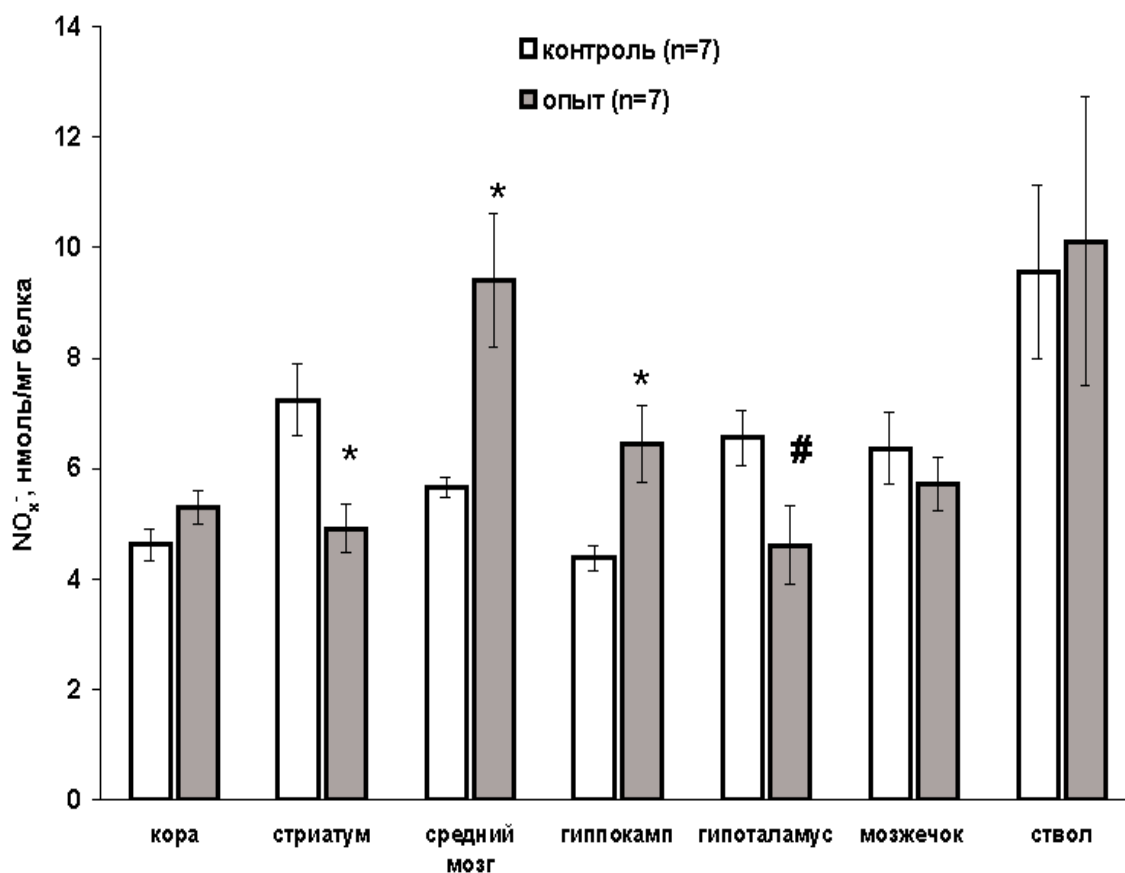


Рисунок 3.

Концентрация NO_x⁻ в отделах мозга при синдроме отмены морфина.

* - достоверность различий (t-тест) от контрольной группы $p < 0,05$, # - $p < 0,1$.

Таблица 3. Корреляции по Спирману активности NOC и концентрации NO_x⁻ с выраженностью синдрома отмены (сумма баллов) морфина в отделах мозга (n=14).

Показатель	Отдел мозга			
	Кора	Мозжечок	Стриатум	Средний мозг
Активность NOC, пмоль/мг /мин	$r=0,54$ $p<0,05$	$r=0,55$ $p<0,05$	$r=0,79$ $p<0,01$	$r=0,81$ $p<0,005$
NO _x ⁻ , нмоль/мг белка	$r=0,62$ $p<0,05$	$r=0,14$ $p>0,1$	$r=0,57$ $p<0,05$	$r=0,76$ $p<0,005$

Таблица 4. Корреляции по Спирману активности NOC и концентрации NO_x⁻ с выраженностью отравиваний по типу мокрой собаки (сумма баллов) в отделах мозга (n=14).

Показатель	Отдел мозга			
	Кора	Мозжечок	Стриатум	Средний мозг
Активность NOC, пмоль/мг /мин	$r=0,31$ $p>0,1$	$r=0,61$ $p<0,05$	$r=0,79$ $p<0,05$	$r=0,81$ $p<0,005$
NO _x ⁻ , пмоль/мг белка	$r=0,56$ $p<0,05$	$r=0,28$ $p>0,1$	$r=0,54$ $p>0,1$	$r=0,91$ $p<0,005$

NO СИНТАЗА МОЗГА ПРИ ОТМЕНЕ МОРФИНА

Таблица 5. Корреляции по Спирману активности NOC и концентрации NO_x^- с выраженностью встряхиваний передними лапами (сумма баллов) в отделах мозга (n=14).

Показатель	Отдел мозга			
	Кора	Мозжечок	Стриатум	Средний мозг
Активность NOC, $\mu\text{моль/мг/мин}$	$r=0,63$ $p<0,05$	$r=-0,29$ $p>0,1$	$r=-0,59$ $p<0,1$	$r=0,35$ $p>0,1$
NO_x^- , нмоль/мг белка	$r=0,02$ $p>0,1$	$r=-0,46$ $p>0,1$	$r=-0,65$ $p<0,05$	$r=0,62$ $p<0,05$

Отмена морфина не вызвала заметных изменений свободнорадикального гомеостаза в отделах мозга. Синдром отмены морфина не сопровождался изменениями в содержании общих и небелковых SH-групп, базальном уровне ТБК-РП, а также ТБК-РП, накопленных в ходе индукции Fe^{2+} /аскорбатной системой, а также активности СОД в отделах мозга (результаты не представлены). Активность ключевого фермента апоптотического каскада – каспазы-3 в исследованных отделах мозга при синдроме отмены морфина также не изменилась (результаты не представлены).

Известно, что при хроническом введении опиатов/опиоидов в головном мозге развивается окислительный стресс [30, 31]. Имеются также свидетельства о развитии апоптоза в головном мозге в данных условиях [32]. Можно было бы предположить, что NO, который способен модулировать окислительный стресс и апоптоз, опосредует данные процессы при абстинентном синдроме. В настоящей работе определялись косвенные показатели окислительного стресса (концентрация ТБК-РП и сульфгидрильных групп) и активность ключевого фермента апоптотического каскада (каспазы-3) с дальнейшим выявлением возможной взаимосвязи с метаболизмом NO. Однако, ни окислительного стресса, ни активации каспазы-3 выявлено не было. Возможно, это связано с неодинаковыми экспериментальными ситуациями в работах различных авторов. Поскольку мы исследовали отдаленный срок после отмены (36 часов), а не хроническую интоксикацию морфином или индуцированную отмену опиатов/опиоидов, как это делали в работах [30-32], то могла произойти регрессия, как окислительного стресса, так и активности каспазы-3. Альтернативным объяснением может быть то, что при абстиненции как окислительный стресс так и апоптоз попросту не развивается. Так, развитие окислительного стресса и/или апоптоза достаточной интенсивности неминуемо привело бы к морфологическим изменениям, а при отмене морфина не обнаружено морфологических изменений в переднем мозге [33]. В данном эксперименте мы также определяли показатели окислительного стресса и активность каспазы-3 в печени, где обнаружили развитие ярко выраженного окислительного стресса при неизменной активности каспазы-3 [34]. Возможно, роль NO в мозге при данных экспериментальных условиях ограничивается исключительно нейромедиаторными/нейромодуляторными функциями.

При опийном СО мы зарегистрировали регио-специфические изменения показателей системы NO, которые не вполне совпадают с результатами проведенных ранее работ [13-19]. Возможным объяснением данных противоречий может быть использование различных экспериментальных условий. Так, в отличие от цитированных работ [13-19], мы исследовали отдаленную спонтанную абстиненцию, а не индуцированную антагонистами опиоидных рецепторов; мы вводили раствор морфина внутривенно, а не вживляли подкожно капсулу с морфином; причем наши исследования были выполнены на крысах, а упомянутые авторы использовали мышей. Мы исследовали довольно крупные нейроанатомические образования, которые состоят из целых структурных ансамблей. Если изменения действительно происходили в отдельных ядрах,

например в ядрах шва, прилежащем ядре или голубом пятне, при использовании нашего методического подхода данные изменения могли просто маскироваться. На наш взгляд, очень важно установление того факта, что показатели нитрергической системы в разных отделах мозга изменялись неодинаково, что является свидетельством дифференцированного функционального состояния различных отделов мозга при СО. Сходный с нашими данными результат (с точки зрения регионарной специфичности изменений системы NO) был получен и при СО [D-Pen², D-Pen⁵]энкефалина, селективного агониста κ-опиоидных рецепторов [35]. При этом активность NOC повысилась в среднем мозге и гипоталамусе, но снизилась в коре и мозжечке и осталась неизменной в стриатуме, гиппокампе и стволе мозга [35]. Возможно данные разнонаправленные изменения в отделах мозга связаны с различным функциональным состоянием в разных отделах мозга подтипов опиоидных рецепторов (плотность, аффинность) [36], которые и лежат в основе проявления поведенческих реакций при абстиненции. В работе [13] была предпринята попытка связать регионарные изменения в системе NO с определенными изменениями при опийной абстиненции. Так, изменения системы NO в обонятельной луковице и ядрах связывают с обонятельной памятью и положительным подкреплением морфина, изменения в одиночном пути (tractus solitarius) связывают с соматическими проявлениями абстиненции, изменения в мозжечке связывают с пластическими процессами (долговременная депрессия), которые сопровождают отмену морфина [13].

Важным является тот факт, что наряду с регио-специфическими изменениями активности NOC и концентрации NO_x мы обнаружили наличие корреляционных отношений (также зависящих от отдела мозга) между интенсивностью отдельных признаков СО морфина (а также интенсивностью СО в целом) и показателями метаболизма NO. Проведенные ранее исследования указывают на способность L-N^G-нитроаргинина (L-NA) и метилового эфира L-N^G-нитроаргинина (L-NAME) (неспецифические ингибиторы NOC) купировать отдельные признаки СО, такие как отряхивания по типу мокрой собаки, диарея и потеря массы тела [11]. Позже этими авторами при использовании селективных ингибиторов NOC [37, 38] было установлено, что именно нейрональная, а не эндотелиальная или индуцибельная изоформы NOC вовлечены в реализацию данного процесса. Кроме того, было показано, что L-NAME эффективно снижает интенсивность абстинентного синдрома в целом [39]. В данном случае результаты нашего корреляционного анализа также являются свидетельством, хотя и косвенным, участия NO в развитии опийного СО за счет опосредования таких признаков, как отряхивания по типу мокрой собаки и встряхивания передними лапами, которые, по сути, являются проявлением судорожной активности. Использование ламотридина (противосудорожное средство) и МК-801 (антагонист NMDA-рецепторов) при отмене морфина приводило к снижению повышенной активности NOC в мозжечке и купированию двигательных признаков абстиненции [16].

При повышении содержания глутамата в синаптической щели активируется каскад NMDA-NO, в результате чего продуцируется NO [40]. Известно, что хроническое введение морфина сопровождается регио-специфическим изменением содержания мРНК NR1 субъединицы NMDA-рецептора в центральной нервной системе [41]. В данной работе зарегистрировано снижение мРНК NR1 в задних рогах спинного мозга, и повышение в большом ядре шва и медиальном таламусе при этом мРНК NR1 остается неизменной в боковом парагигантоклеточном ядре, голубом пятне, околопроводном сером веществе и сенсомоторной коре [41]. Интересно, что совместное с морфином введение селективного антагониста NMDA-рецепторов LY274614 нивелирует не только развитие толерантности к морфину, но изменения в содержании мРНК субъединицы NR1 [41]. Также известно, что при хроническом введении морфина происходит повышение содержания белка NR2A субъединицы NMDA рецептора в околопроводном сером веществе, вентральной области покрышки и прилежащем

ядре (*nucleus accumbens*) [42]. Подобных изменений не было обнаружено в гиппокампе и миндалине, в то же время мыши C57BL/6j, нокаутные по данному белку, демонстрируют опииную абстиненцию, менее выраженную по сравнению с диким типом. Опираясь на результаты исследования роли NMDA-рецепторов в отделах мозга при абстиненции [41, 42], можно предположить что разнонаправленные регио-специфические изменения биохимических показателей системы NO, а также разнонаправленные корреляции этих показателей с признаками абстиненции в отделах мозга, возможно, связаны с различным функциональным состоянием NMDA-рецепторов в отделах мозга. Возможно, что NO при опиинной абстиненции является определяющим связующим звеном между опиоидергической и глутаматергической медиаторными системами в ходе развития абстиненции, тем более, что взаимосвязь данных нейромедиаторных систем известна и определенная роль в ней отводится NO [43].

На данный момент не совсем понятно, какие молекулярные механизмы приводят к изменению продукции NO при опиинной абстиненции. Установлено, что при СО опиоидов в отделах головного мозга происходит гиперактивация протеинкиназы A и C [44]. В частности, показано, что при спонтанной и индуцированной отмене морфина и других препаратов опиинной группы (героина, метадона) происходит увеличение содержания иммунореактивного белка и мРНК изоформ протеинкиназы C α и β в отделах мозга [45]. Известным механизмом регуляции активности NOC является ее фосфорилирование протеинкиназами такими как протеинкиназа A и C [46, 47]. Причем показано, что фосфорилирование ферментативного комплекса NOC посредством протеинкиназы A приводит к уменьшению активности NOC [46], а при фосфорилировании протеинкиназой C может приводить либо к уменьшению активности фермента [46], либо к активации [47]. Возможно, что фосфорилирование белкового комплекса NOC может быть одним из механизмов регуляции активности NOC при опиинной абстиненции. Помимо прямого влияния протеинкиназ на активность NOC описан механизм опосредованной модуляции каталитической активности NOC. При отмене морфина происходит активация протеинкиназы C, которая при фосфорилировании NMDA-рецептора может приводить к увеличению проницаемости кальция через ионный канал рецептора и последующей активации кальций-зависимой NOC [48].

Нейрофизиологическим проявлением изменения состояния системы NO при опиинной абстиненции может быть модуляция ряда нейромедиаторных систем. Так известно, что NO способен модулировать активность целого ряда нейромедиаторных систем, таких как катехоламинергическая, серотонинергическая, глутаматергическая, по зависимым и независимым от cGMP путям [49]. Важно отметить, что опиинная абстиненция купируется ODQ - ингибитором гуанилатциклазы, фермента катализирующего образование cGMP [50]. В свою очередь изменения активности медиаторных систем, которые, возможно, опосредованы NO, могут определять патофизиологическую картину абстинентного синдрома.

Таким образом, регио-специфичные изменения показателей метаболизма NO в мозге при спонтанном синдроме отмены морфина, а также наличие корреляционных отношений показателей нитергической системы с выраженностью абстиненции и отдельными ее признаками, выявленные в нашей работе, подтверждают положение о том, что NO является одним из звеньев в молекулярно-клеточном механизме опиинной абстиненции.

Работа выполнена при поддержке грантов РГНФ № 03-06-00146а и РФФИ № 02-04-49452.

ЛИТЕРАТУРА

1. Петровский Б.В. (ред.) (1983) Энциклопедический словарь медицинских терминов. М.: Советская энциклопедия. **1**, 560.
2. Torres G., Horowitz J.M. (1999) Psychosom. Med., **61**, 630-650.
3. Williams J.T., Christie M.J., Manzoni O. (2001) Physiol. Rev., **81**, 299-343.
4. Cami J., Farre M. (2003) New Engl. J. Med., **349**, 975-986.
5. Nestler E.J. (2001) Nat. Rev. Neurosci., **2**, 119-128.
6. Eisch A.J., Barrot M., Schad C.A. et al. (2000) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **97**, 7579-7584.
7. Moncada S., Palmer R.M.J., Higgs E.A. (1991) Pharmacol. Rev., **43**, 109-142.
8. Esplugues J.V. (2002) Br. J. Pharmacol., **135**, 1079-1095.
9. Sahraei H., Poorheidari G. et al. (2004) Pharmacol. Biochem. Behav., **77**, 111-116.
10. Pasternak G.W., Kolesnikov Y.A., Babey A.M. (1995) Neuropsychopharmacology, **13**, 309-313.
11. London E.D., Kimes A.S., Vaupel D.B. (1995) NIDA Res. Monogr., **147**, 170-181.
12. Дюйзен И.В., Мотавкин П.А., Шорин В.В. (2001) Бюлл. эксп. биол. мед., **132**, 354-357.
13. Cuellar B., Fernandez A.P., Lizasoain I. et al. (2000) Psychopharmacology (Berl.), **148**, 66-73.
14. Cappendijk S.L.T., Garrelds I.M., Dzoljic M.R. (1994) Nitric oxide and nervous system. Laurentians Mountains. Montreal, Canada, Abstracts 1-18.
15. Leza J.C., Lizasoain I., Cuellar B. et al. (1996) Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol., **353**, 349-354.
16. Lizasoain I., Leza J.C., Lizasoain I. et al. (1996) Eur. J. Pharmacol., **299**, 41-45.
17. Li J., Li X., Pei G., Qin B.Y. (1999) Zhongguo Yao Li Xue Bao., **20**, 375-380.
18. Kumar S., Bhargava H.N. (1997) Gen. Pharmacol., **29**, 223-227.
19. Babey A.M., Kolesnikov Y., Cheng J. et al. (1994) Neuropharmacology, **33**, 1463-1470.
20. Rahman S., Ali Khan R., Kumar A. (2002) BMC Complement. Altern. Med., **2**(1), 6.
21. Dum J., Blasig J., Herz A. (1981) Eur. J. Pharmacol., **70**, 293-300.
22. Blasig J., Herz A., Reinhold K., Zieglgansberger S. (1973) Psychopharmacologia (Berl.), **33**, 19-38.
23. Misko T.P., Schilling R.J., Salvemini D. et al. (1993) Anal. Biochem., **214**, 11-16.
24. Онуфриев М.В., Семенова Т.П., Колаева С.Г. и соавт. (2002) Нейрохимия, **19**, 264-268.
25. Яковлев А.А., Гуляева Н.В. (2004) Биомед. химия, **50**, 390-397.
26. Каган В.Е., Прилипко Л.Л., Савов В.М. и соавт. (1979) Биохимия, **44**, 379-385.
27. Nishikimi M., Rao N.A., Yagi K. (1972) Biochem. Biophys. Res. Commun., **46**, 849-855.
28. Яковлев А.А., Онуфриев М.В., Степаничев М.Ю. с соавт. (2001) Нейрохимия, **18**, 41-43.
29. Bradford M.M. (1976) Anal. Biochem., **72**, 248-254.
30. Константинопольский М.А., Пирожков С.В., Соловьева А.Г., Панченко Л.Ф., Барков Н.К. (1992) Эксперим. клин. фармакол., **55**, 21-24.
31. Панченко Л.Ф., Пирожков С.В., Соловьева А.Г. (1995) Вопросы наркологии, **2**, 32-36.
32. Boronat M., Garcia-Fuster M.J., Garcia-Sevilla J.A. (2001) Br. J. Pharmacol., **134**, 1263-1270.
33. Turski W.A., Czuczwar S.J., Kleinrok Z., Turski L. (1983) Life Sci., **33**, 397-400.
34. Панченко Л.Ф., Перегуд Д.И., Яковлев А.А. и соавт. (2004) Биомед. химия, **50**, 460-470.
35. Bhargava H.N., Cao Y.J. (1998) Peptides, **19**, 113-117.
36. Головки А.И., Леонтьева Л.В., Головки С.И. и соавт. (2003) Нейрохимия, **20**, 245-258.

37. Vaupel D.B., Kimes A.S., London E.D. (1995) Psychopharmacology (Berl), **118**, 361-368.
38. Vaupel D.B., Kimes A.S., London E.D. (1997) Eur. J. Pharmacol., **324**, 11-20.
39. Ozek M., Uresin Y., Gungor M. (2003) Life Sci., **72**, 1943-1951.
40. Brecht D.S., Snyder S.H. (1994) Annu. Rev. Biochem., **63**, 175-195.
41. Zhu H., Brodsky M., Gorman A.L., Inturrisi C.E. (2003) Mol. Brain Res., **114**, 154-162.
42. Inoue M., Mishina M., Ueda H. (2003) J. Neurosci., **23**, 6529-6536.
43. Mao J. (1999) Brain Res. Rev., **30**, 289-304.
44. Nestler E.J., Aghajanian G.K. (1997) Science, **278**, 58-63.
45. Ventayol P., Busquets X., Garcia-Sevilla J.A. (1997) Naunyn. Schmiedeberg's Arch. Pharmacol., **355**, 491-500.
46. Brecht D.S., Ferris C.D., Snyder S.H. (1992) J. Biol. Chem., **267**, 10976-10981.
47. Nakane M., Mitchell J., Forstermann U., Murad F. (1991) Biochem. Biophys. Res. Commun., **180**, 1396-1402.
48. Liu J.G., Anand K.J.S. (2001) Brain Res. Rev., **38**, 1-19.
49. Ohkuma S., Katsura M. (2001) Prog. Neurobiol., **64**, 97-108.
50. Sullivan M.E., Hall S.R., Milne B., Jhamandas K. (2000) Brain Res., **859**, 45-56.

Поступила: 10. 11. 2004.

NITRIC OXIDE SYNTHASE ACTIVITY AND NITRATES/NITRITES LEVEL IN BRAIN REGIONS DURING THE SPONTANEOUS MORPHINE WITHDRAWAL IN RATS

*D.I. Peregud¹, M.V. Onufriev², A.A. Yakovlev^{2,3}, M.Y. Stepanichev², N.A. Lazareva²,
T.V. Pavlova², L.F. Panchenko¹, N.V. Gulyaeva²*

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

²Institute of Higher Nervous Activity and Neurophysiology RAS, Moscow, Russia

³Moscow Institute of Physics and Technology, Dolgoprudnyi, Moscow region, Russia

Nitric oxide synthase (NOS) activity and nitrate/nitrites (NO_x^-) concentrations were measured in brain regions of rats during the spontaneous morphine withdrawal. Male Wistar rats were injected intraperitoneally with morphine hydrochloride at increasing doses (10-100 mg/kg) during 6 days twice a day. Thirty six hours after the last injection the severity of the spontaneous morphine withdrawal syndrome was determined by specific autonomic and locomotor indices. Both NOS activity and NO_x^- levels increased in the midbrain and the hippocampus, decreased in the striatum and the hypothalamus, and did not change in the cerebral cortex and the brain stem. NO_x^- concentrations in the cerebellum did not change, while NOS activity decreased. Both NOS activities and NO_x^- concentrations in the cerebral cortex, striatum, midbrain, and cerebellum correlated with withdrawal syndrome severity on the whole, and with the specific signs of abstinence.

Key words: spontaneous morphine withdrawal, nitric oxide, nitric oxide synthase, nitrate/nitrite concentration, brain, rats.