

УДК 547.015.+615.212.7.015.15.015.4.

©Лелевич, Новокшионов

СОСТОЯНИЕ НЕЙРОМЕДИАТОРНЫХ СИСТЕМ В НЕКОТОРЫХ ОТДЕЛАХ ГОЛОВНОГО МОЗГА КРЫС ПРИ ХРОНИЧЕСКОЙ МОРФИНОВОЙ ИНТОКСИКАЦИИ

С.В. Лелевич^{1}, А.А. Новокшионов²*

¹Гродненский государственный медицинский университет, ул. Горького, 80,
Гродно, 230009 Республика Беларусь; тел. (0152) 53-23-91; факс (0152) 43-53-41;
эл. почта: slelevich@yandex.ru

²ГНУ “Институт биохимии” Национальной академии наук Беларуси

В динамике хронической морфиновой интоксикации (7-21 день) изучено содержание нейромедиаторов и их метаболитов в коре больших полушарий, таламической области и стволе головного мозга крыс. Введение морфина в течение 7-14 дней сопровождается изменением функционирования катехоламиновой системы, наиболее выраженным в таламической области и стволе мозга. Оно проявляется в усиленной секреции дофамина и норадреналина из депо с понижением их уровня в ткани мозга и увеличением содержания продуктов катаболизма. Изменения содержания серотонина и ГАМК менее выражены и проявляются в понижении уровня первого и повышении содержания второго нейромедиатора в отдельные сроки наркотизации.

Ключевые слова: морфин, мозг, дофамин, норадреналин, серотонин, ГАМК.

ВВЕДЕНИЕ. Опиийная наркомания сопровождается рядом нейромедиаторных перестроек, выраженность которых определяется длительностью наркотической интоксикации, видом наркотика и рядом других переменных факторов [1]. Это согласуется с различными клиническими вариантами течения данной патологии при проявлении основных синдромов заболевания [2-4]. При длительном потреблении опиоидов в организме происходят нарушения метаболизма, которые начинают выступать в качестве причины, инициирующей формирование функциональной системы потребления наркотиков [3]. В патогенезе развития опиийной наркомании значительную роль отводят нарушениям взаимодействия нейромедиаторных систем [1, 5]. При этом отмечают [6], что ключевое значение имеет стадийное нарушение функционального состояния катехоламиновой системы. Однократное введение морфина вызывает комплекс изменений в метаболизме дофамина и норадреналина в мозге, тогда как хроническая наркотизация приводит к менее выраженным изменениям, что указывает на развитие толерантности к эффектам наркотика [7]. Подчеркивают ведущую роль дофаминовой системы в формировании мотивационных установок на поиск психоактивных веществ (ПАВ), вызывающих зависимость [8]. Дофамин является ведущим медиатором системы “поощрения” головного мозга [9]. Предполагают, что снижение активности системы “поощрения” является важным фактором, способствующим формированию зависимости от ПАВ. В то же время, опиаты осуществляют свое действие, как через систему “поощрения”, так и через другие

* - адресат для переписки

морфо-функциональные структуры [3, 7, 9]. Имеются указания на изменение активностей основных регуляторных систем – аденилатциклазной, протеинкиназной, а также концентрации G-белков в процессе хронического воздействия агонистами опиоидных рецепторов [10]. Важную роль в реализации действия наркотиков играют такие биологически активные вещества, как эндогенные опиаты пептидной и не пептидной природы, серотонинергические синапсы, аминокислотные нейромедиаторные системы [11]. Следует также учитывать тесную функциональную связь нейрохимических процессов, региональность их изменений в ЦНС с длительностью наркотизации. Хроническую морфиную интоксикацию можно рассматривать как экспериментальный прообраз клинической наркомании.

В связи с этим в эксперименте мы воспроизвели данную ситуацию с целью изучения состояния нейромедиаторных систем в различных отделах головного мозга крыс в динамике хронической морфиновой интоксикации.

МЕТОДИКА. Опыты выполнены на 32 белых беспородных крысах-самцах массой 180-200 г. Животных содержали на стандартном пищевом рационе вивария при свободном доступе к воде. Воспроизведение модели хронической морфиновой интоксикации проводили, исходя из имеющихся аналогов [5, 12].

Экспериментальным животным внутрибрюшинно (в/б) вводили раствор морфина гидрохлорида в течение 7 (2-я группа), 14 (3-я группа) и 21 суток (4-я группа) два раза в сутки с интервалом в 12 ч в нарастающих дозах: 1-2 сут – 10 мг/кг/сут; 3-4 сут – 20 мг/кг/сут, оставшиеся дни – 40 мг/кг/сут. Декапитацию проводили через 1 ч после последней инъекции. Контрольные животные (1-я группа) в/б получали эквивалентное количество физиологического раствора NaCl. После забоя животных, на холоде извлекали головной мозг и выделяли следующие отделы: кору больших полушарий, таламическую область и ствол, которые замораживали в жидком азоте.

Определение уровней биогенных аминов и их производных проводили в хлорных экстрактах. Образцы тканей (20-80 мг) взвешивали и гомогенизировали в 10 объемах 0,2 М HClO₄, содержащей внутренние стандарты: для определения биогенных аминов и их производных – ванилиновую кислоту (400 нМ), аминокислот и их производных – δ-аминовалериановую кислоту (0,25 мМ), а также 50 мг/л ЭДТА и 50 мг/л Na₂S₂O₅ в качестве антиоксиданта.

Уровни биогенных аминов, их предшественников и метаболитов определяли на ВЭЖХ-системе Waters, состоящей из системы подачи растворителей M501 с демпфером пульсаций, термостата колонок TCM, инжектора Rheoolyne 7125 и амперометрического детектора M460 (Waters Assoc., США) [13, 14].

Определение биогенных аминов и их метаболитов проводили методом ион-парной ВЭЖХ: колонка Сепарон SGX C₁₈, 5мкМ, 3×15 мМ (Элсико, Россия); подвижная фаза: 0,1 М KH₂PO₄; 17 мМ CH₃COOH; pH 3,55; гептилсульфонат натрия 200 мг/л; октилсульфонат натрия 200 мг/л; ЭДТА 0,1 мМ, с добавлением 11,5 об. % метанола. Скорость потока 0,5 мл/мин, температура колонки 27°C. Детектирование электрохимическое, потенциал рабочего электрода 0,78 В, постоянная времени 2 с [13]. Калибровку осуществляли с помощью смеси стандартов, содержащей 100 мкМ Тут, 10 мкМ Тгр и 1 мкМ остальных веществ.

Определение ГАМК проводили методом обращенно-фазной хроматографии после предколоночной дериватизации с о-фталевым альдегидом и с изократическим элюированием и детектированием по флуоресценции на той же хроматографической системе с детектором флуоресценции M 420 (Waters Assoc.) [14].

Приём и обработку хроматограмм осуществляли с помощью программно-аппаратного комплекса “Мульти-Хром-1”, обработку хроматограмм – по методу внутреннего стандарта.

Статистическую обработку данных проводили с использованием непараметрических методов исследования, применяя U-критерий Манна-Уитни.

Данные выражали в виде Ме (медиана) и рассеяния (25 и 75 перцентилей). Статистически значимыми считались отличия при $p < 0,05$. В качестве дополнительного метода статистической обработки был применен пошаговый дискриминантный анализ. Для этого использовали пакет статистических программ "Statistika 6.0".

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ. Хроническая морфиновая интоксикация сопровождалась определёнными нейромедиаторными отклонениями, выраженность которых зависела от длительности наркотизации и имела региональные особенности.

В коре больших полушарий уровень определяемых нейромедиаторов и их метаболитов на фоне длительного введения морфина изменяется менее значительно в сравнении с другими отделами головного мозга. Содержание дофамина, норадреналина, 5-окситриптофана остается стабильным на протяжении всего периода наркотизации. Уровень одного из метаболитов дофамина – гомованилиновой кислоты повышается через 7 сут назначения морфина на 43%, а 3,4-диоксифенилуксусной кислоты – к концу 14 сут морфинизации на 59% в сравнении с контрольной группой. Содержание серотонина в данном отделе мозга статистически значимо снижается через 21 день, а продукта его катаболизма – 5-оксииндолуксусной кислоты – на 14 и 21 сут введения морфина (рис. 1). Уровень основного медиатора торможения – ГАМК – повышается в корковом отделе мозга через 14 и 21 сут от начала морфинизации (рис. 1).

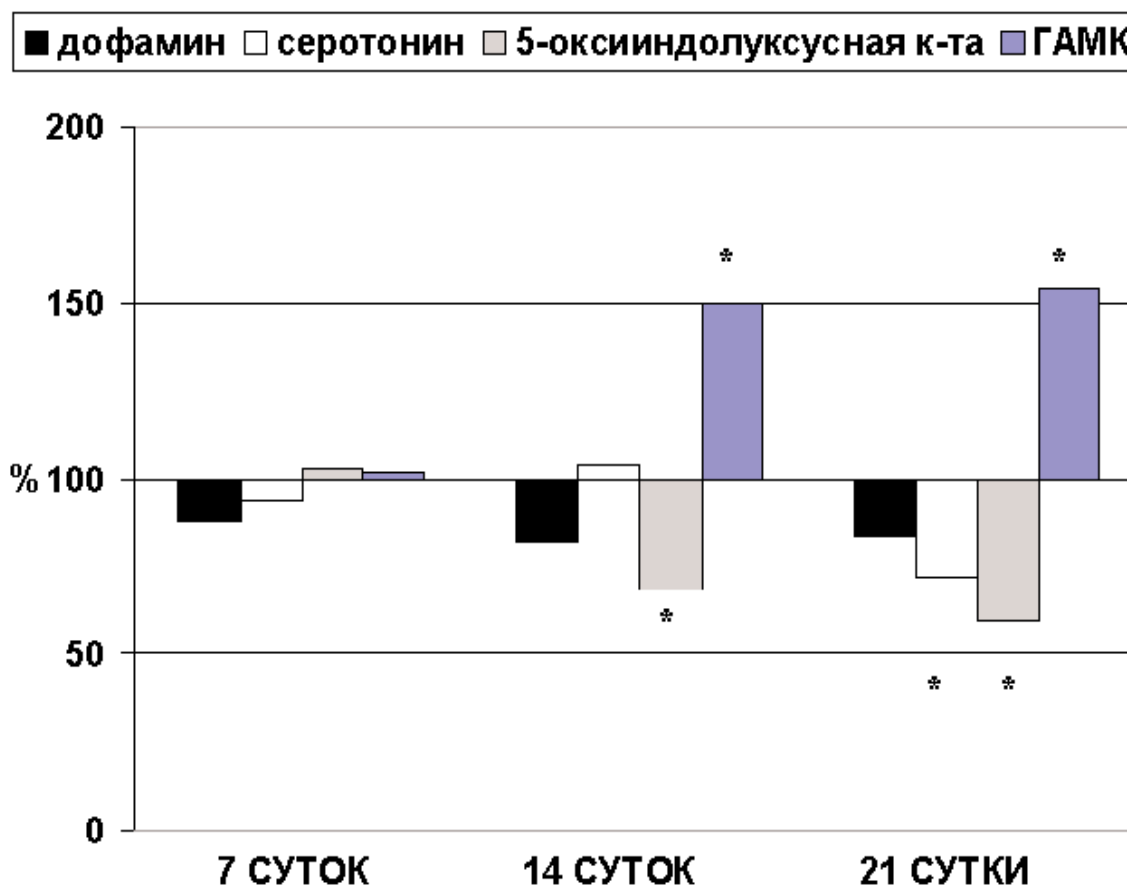


Рисунок 1.

Содержание дофамина, серотонина, 5-оксииндолуксусной кислоты и ГАМК в коре больших полушарий головного мозга крыс в динамике хронической морфиновой интоксикации. 100% - контроль. * - статистически значимые различия с контролем ($p < 0,05$).

НЕЙРОМЕДИАТОРЫ МОЗГА ПРИ ИНТОКСИКАЦИИ МОРФИНОМ

В более ранних работах выявлено [12], что изменения синапсов коры больших полушарий при хронической морфиновой интоксикации складываются из нескольких процессов: повреждения и уменьшения количества синаптических пузырьков, активации некоторых частей синапсов и образования новых межнейрональных контактов. Это, в определенной степени, подтверждает гипотезу о первичном действии морфина на синаптические механизмы [15]. Ранее нами было показано [16], что при увеличении длительности морфиновой интоксикации с 7 до 21 сут фонд заменимых и гликогенных аминокислот в коре больших полушарий остается стабильным на более низком, в сравнении с интактными животными, уровне, а пул незаменимых и кетогенных аминокислот постепенно снижается. При этом отмечалось повышение уровня тормозных аминокислот, что согласуется с полученными в данном эксперименте результатами.

Нарушения метаболизма катехоламинов на фоне хронической морфиновой интоксикации проявлялись в таламической области в большей степени, чем в коре больших полушарий (табл. 1). К концу первой недели введения морфина (группа 2) здесь отмечалось статистически значимое снижение содержания дофамина и норадреналина при повышении уровней их метаболитов – 3,4-диоксифенилуксусной и гомованилиновой кислот. Это свидетельствует об усиленном выбросе данных медиаторов в синаптическую щель под действием морфина. Содержание серотонина и ГАМК у особей 2-й группы в данном регионе мозга не отличалось от значений контрольной группы. Удлинение сроков наркотизации до 2-х недель (группа 3) сопровождалось снижением уровня дофамина и повышением содержания гомованилиновой кислоты в таламической области (табл. 1). При этом концентрации норадреналина и серотонина оставались неизменными в сравнении с контрольной группой, а уровень ГАМК увеличивался на 92%. Через три недели от начала введения морфина (группа 4) в данном отделе мозга отмечается повышение содержания синаптического метаболита дофамина – гомованилиновой кислоты, понижение уровня серотонина и 5-оксииндолуксусной кислоты.

Таблица 1. Содержание нейромедиаторов и их метаболитов (нмоль/г ткани) в таламической области головного мозга крыс при хронической морфиновой интоксикации.

Показатель	Группы			
	I (контроль)	II (7 суток)	III (14 суток)	IV (21 сутки)
Дофамин	3,107 (3,028; 3,156)	1,622 (1,541; 1,699)*	1,735 (1,609; 1,823)*	2,978 (2,795; 3,162)
3,4-диоксифенил- уксусная кислота	0,380 (0,368; 0,409)	0,674 (0,621; 0,706)*	0,403 (0,390; 0,433)	0,418 (0,394; 0,427)
Гомованилиновая кислота	0,527 (0,480; 0,604)	0,850 (0,777; 0,880)*	0,807 (0,793; 0,840)*	0,811 (0,798; 0,829)*
Норадреналин	2,537 (2,432; 2,596)	1,197 (1,117; 1,467)*	2,504 (2,453; 2,569)	2,531 (2,487; 2,582)
5-окситриптофан	0,226 (0,219; 0,246)	0,235 (0,217; 0,261)	0,225 (0,205; 0,250)	0,249 (0,214; 0,266)
Серотонин	0,253 (0,227; 0,270)	0,241 (0,221; 0,274)	0,244 (0,231; 0,257)	0,130 (0,114; 0,137)*
5-оксииндол- уксусная кислота	0,204 (0,193; 0,222)	0,204 (0,181; 0,211)	0,115 (0,101; 0,127)*	0,124 (0,097; 0,135)*
ГАМК	1910,0 (1854,7; 1949,8)	1941,3 (1903,1; 1958,9)	3664,3 (3574,8; 3757,1)*	1925,5 (1904,7; 1956,3)

Примечание: Здесь и в табл. 2 данные представлены в виде Ме и рассеяния (25 и 75%);
* - статистически значимые различия с контролем ($p < 0,05$).

Выраженные нейромедиаторные изменения на фоне хронической морфиновой интоксикации были отмечены также в стволе головного мозга (табл. 2). У особей 2-й группы статически значимо снижено содержание дофамина (на 28%) и норадреналина (на 42%). При этом отмечено повышение уровней их метаболитов – 3,4-диоксифенилуксусной и гомованилиновой кислот. Недельная морфиновая интоксикация не влияла на содержание компонентов серотонинергической системы в данном регионе головного мозга, а уровень ГАМК увеличивался в сравнении с контролем. К концу двухнедельной морфиновой интоксикации (3-я группа) в стволе головного мозга, также как и у животных предыдущей экспериментальной группы, отмечены признаки усиленного высвобождения катехоламинов из депо. Это подтверждает снижение уровней дофамина и норадреналина на 28 и 38%, соответственно, в сравнение с контрольной группой. При этом увеличиваются концентрации их метаболитов – 3,4-диоксифенилуксусной и гомованилиновой кислот (табл. 2).

Таблица 2. Содержание нейромедиаторов и их метаболитов (нмоль/ г ткани) в стволе головного мозга крыс при хронической морфиновой интоксикации.

Показатель	Группы			
	I (контроль)	II (7 суток)	III (14 суток)	IV (21 сутки)
Дофамин	0,711 (0,685; 0,756)	0,517 (0,491; 0,565)*	0,517 (0,468; 0,573)*	0,509 (0,492; 0,568)*
3,4-диоксифенилуксусная кислота	0,181 (0,166; 0,219)	0,355 (0,288; 0,382)*	0,352 (0,270; 0,428)*	0,192 (0,170; 0,211)
Гомованилиновая кислота	0,205 (0,193; 0,222)	0,542 (0,491; 0,584)*	0,453 (0,401; 0,481)*	0,458 (0,439; 0,485)*
Норадреналин	1,710 (1,681; 1,743)	1,003 (0,945; 1,166)*	1,055 (0,945; 1,173)*	1,686 (1,642; 1,713)
5-окситриптофан	0,891 (0,873; 0,991)	0,880 (0,852; 0,905)	0,906 (0,864; 0,921)	0,951 (0,896; 0,972)
Серотонин	0,780 (0,746; 0,820)	0,746 (0,733; 0,762)	0,494 (0,477; 0,537)*	0,431 (0,402; 0,474)*
5-оксиндиксуксусная кислота	0,833 (0,820; 0,853)	0,850 (0,805; 0,910)	0,616 (0,588; 0,644)*	0,821 (0,810; 0,836)
ГАМК	1222,6 (1195,4; 1279,9)	1797,6 (1734,2; 1810,1)	1308,7 (1208,4; 1356,2)	1228,6 (1162,8; 1303,3)

Как полагают некоторые авторы [17], в стволовой части мозга есть область, которая называется “системой подкрепления”. Эта система участвует в регуляции мотиваций, эмоционального состояния, и ее важным элементом являются катехоламины [6]. При повторном потреблении морфина происходит высвобождение нейромедиаторов из депо, что, в конечном итоге, влечёт за собой истощение их запасов. В такой ситуации срабатывают компенсаторные механизмы, проявляющиеся в усилении синтеза катехоламинов. Эти динамические изменения функционального состояния катехоламиновой системы подтверждаются изменениями уровней дофамина и норадреналина в стволе мозга при увеличении

НЕЙРОМЕДИАТОРЫ МОЗГА ПРИ ИНТОКСИКАЦИИ МОРФИНОМ

сроков наркотизации с 7 до 21 сут (табл. 2). Усиление синтеза катехоламинов при длительном потреблении опиатов связывают с началом формирования физической зависимости [15]. У животных 3-й группы понижается содержание серотонина и 5-оксииндолуксусной кислоты, тогда как уровень ГАМК не изменяется. Трехнедельная морфиновая интоксикация сопровождается снижением содержания дофамина и серотонина в стволе мозга. Уровни других определяемых нейромедиаторов при этом не отличаются от контроля, а концентрация гомованилиновой кислоты увеличена.

В качестве дополнительного метода статистической обработки с целью демонстрации разграничения экспериментальных групп по всему кругу исследованных показателей в таламической области и стволе головного мозга был использован пошаговый дискриминантный анализ. Результаты, отражённые на рисунке 2, показывают, что наиболее существенные нарушения нейромедиаторных процессов в таламусе наблюдались на 7-е сутки хронической алкогольной интоксикации с относительной их нормализацией к концу эксперимента (21 сутки). В стволе головного мозга выраженность нейромедиаторных нарушений была примерно одинаковой у животных всех экспериментальных групп, с незначительным превалированием таковых на 14 сутки хронической алкоголизации (рис. 3).

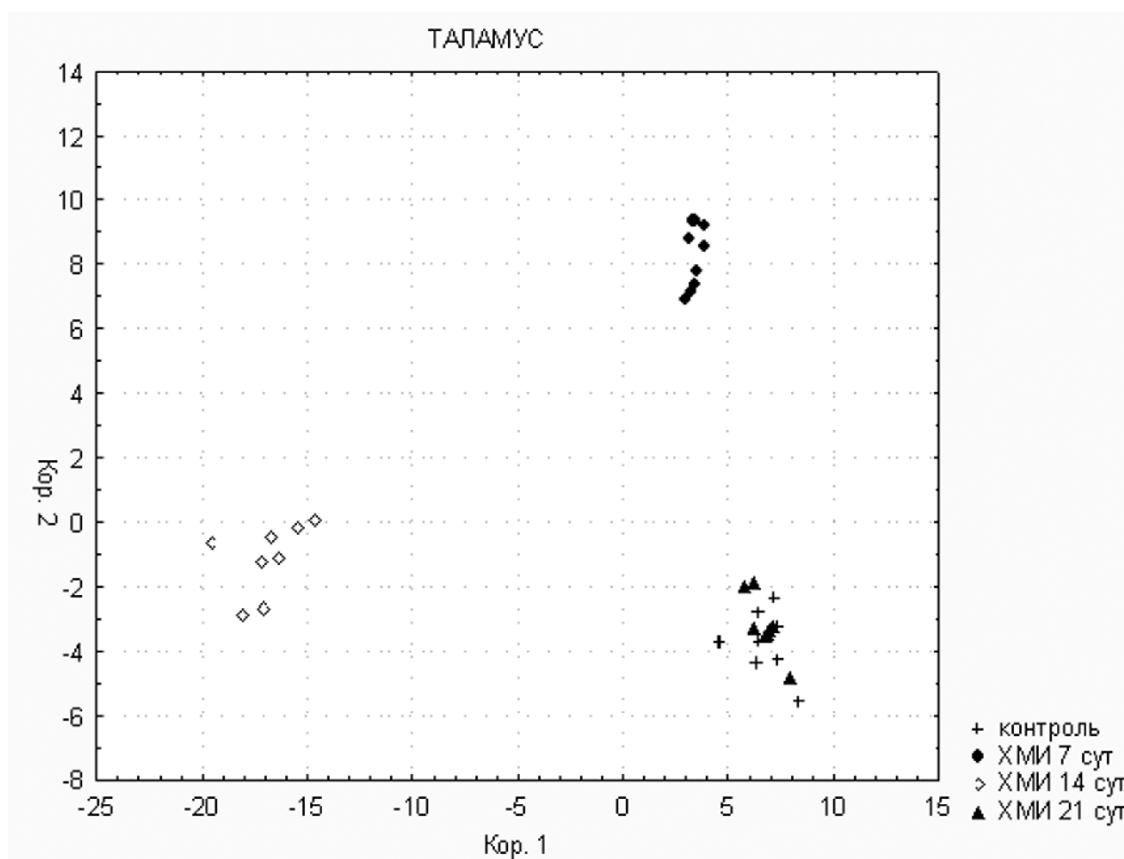


Рисунок 2.

Расположение реализаций экспериментальных групп для пула исследованных соединений в таламусе головного мозга крыс на плоскости двух главных компонент в динамике хронической морфиновой интоксикации. ХМИ - хроническая морфиновая интоксикация.

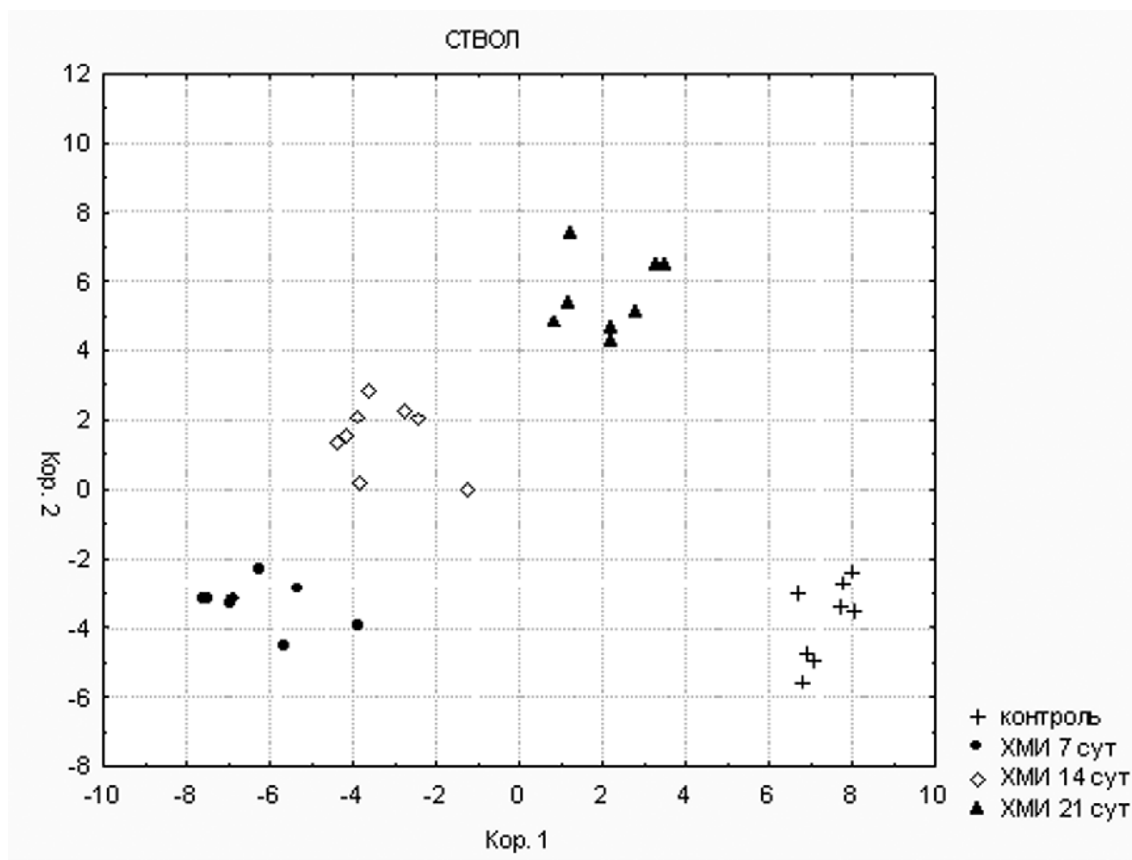


Рисунок 3.

Расположение реализаций экспериментальных групп для пула исследованных соединений в стволе головного мозга крыс на плоскости двух главных компонент в динамике хронической морфиновой интоксикации. ХМИ - хроническая морфиновая интоксикация

ЗАКЛЮЧЕНИЕ И ВЫВОДЫ. Хроническая морфиновая интоксикация сопровождается изменением функционирования катехоламиновой системы, наиболее выраженным в таламической области и стволе мозга. Это проявляется усиленной секрецией нейромедиаторов из депо, понижением их уровней в ткани мозга, а также увеличением содержания продуктов катаболизма. Изменения содержания серотонина и ГАМК менее выражены и проявляются в понижении уровня первого и повышении содержания второго нейромедиатора в отдельные сроки наркотизации.

ЛИТЕРАТУРА

1. Головкин А.И., Конопкин Д.А., Некрасов Ю.А. и др. (2000) *Нейрохимия*, **17**(1), 3-12.
2. Фридман Л.С., Флеминг Н.Ф., Робертс Д.Г., Хайман С.Е. (1998) *Наркология* (пер. с англ.), Бином, М.
3. Мецержков А.Ф., Судаков С.К. (1991) *Вопр. наркологии*, **2**, 33-39.
4. Благоев Л.Н. (2005) *Наркология*, **6**, 43-49.

НЕЙРОМЕДИАТОРЫ МОЗГА ПРИ ИНТОКСИКАЦИИ МОРФИНОМ

5. *Лелевич С.В.* (2007) Метаболические аспекты морфиновой наркологии, Из-во ГрГМУ, Гродно.
6. *Анохина И.П., Коган Б.М., Маньковская И.В. и др.* (1990) Фармакол. и токсикол., **55**(4), 4-9.
7. *Майский А.И., Ведерникова Н.Н., Чистяков В.В., Лапин В.В.* (1982) Биологические аспекты наркоманий, Медицина, М.
8. *Herz A., Shippenberg T., Bals-Kubik R.* (1992) *Arzneim-Forsch*, **42**(2A), 256-259.
9. *Vetulani J.* (1998) *Pol. J. Pharmacol.*, **50**, 31.
10. *Wenger T., Moldrich G., Furst S.* (2003) *Brain Res. Bull.*, **61**(2), 125-128.
11. *Levi M., Borne R.* (2002) *Curr. Med. Chem.*, **9**(20), 1807-1818.
12. *Морозов Г.В., Боголепов Н.Н.* (1984) Морфинизм, М.
13. *Нефедов Л.И., Дорошенко Е.М., Смирнов В.Ю. и др.* (1996) Укр. биохим. журн., **68**(1), 21-26.
14. *Дорошенко Е.М., Нефедов Л.И., Климович И.И. и др.* (1994) Здравоохранение Беларуси, **12**, 20-23.
15. *Жила В.А., Струменская Е.Н.* (1986) в: Экспериментальная и клиническая физиология болеутоляющих средств, Л, сс. 160-161.
16. *Курбат М.Н., Лелевич В.В.* (2002) Эксперим. и клин. фармакол., **65**(5), 27-28.
17. *Анохина И.П.* (2000) в: Лекции по наркологии (под ред. Н.Н. Иванца) Нолидж, М. сс. 16-40.

Поступила: 26. 05. 2008.

NEUROMEDIATOR SYSTEMS IN SOME BRAIN REGIONS OF RATS SUBJECTED TO MORPHINE INTOXICATION

S.V. Lelevich¹, A.A. Novokshonov²

¹Grodno State Medical University, Gorky str., 80, Grodno, 230009 Belarus; tel.: (0152) 53-23-91; fax: (0152) 43-53-41; e-mail: slelevich@yandex.ru

²Institute of Biochemistry, Byelorussian Academy of Sciences

The content of neuromediators and its metabolites in the cortex of cerebral hemispheres, in thalamus and brain stem was studied under chronic morphine intoxication (7-21 days). The morphine intake during 7-14 days was accompanied by changes of catecholamine system functioning, which was the most pronounced in the thalamus and the brain stem. These changes included increased secretion of dopamine and noradrenaline, their decrease in the brain tissue, and the increased content of their metabolites. The changes of serotonin and GABA content were less pronounced and included a decrease of serotonin level and the increase of the GABA content in different periods of narcotization.

Key words: morphin, brain, dopamin, noradrenalin, serotonin, GABA.