

УДК 615.015.6+613.83

©Коллектив авторов

СОСТОЯНИЕ СВОБОДНОРАДИКАЛЬНЫХ ПРОЦЕССОВ В ДИНАМИКЕ РАЗВИТИЯ ХРОНИЧЕСКОЙ МОРФИНОВОЙ ИНТОКСИКАЦИИ

Д.А. Мискевич^{1*}, Н.Э. Петушок¹, В.В. Лелевич¹,
С.В. Лелевич², А.Н. Бородинский¹

¹Институт биохимии Национальной академии наук Беларуси, 230017, Гродно, БЛК-50; тел.: +375 0152 337835; эл. почта: dr.mengel@aport2000.ru

²Гродненский государственный медицинский университет, 230015, Беларусь, Гродно, Горького 80; тел.: +375 0152336679

Исследовано состояние ферментативного звена антиоксидантной системы и интенсивность процессов перекисного окисления липидов (ПОЛ) в печени, уровень оксида азота в плазме крови крыс в динамике хронической морфиновой интоксикации. Эксперименты были выполнены на белых крысах самцах линии Wistar, которые получали внутрибрюшинно 1% раствор морфина гидрохлорида (два раза в сутки). Доза наркотика постепенно увеличивалась: 10 мг/кг массы тела в течение 1-2 суток, 20 мг/кг-3-4 сутки, 40 мг/кг начиная с 5 суток до конца эксперимента. В зависимости от длительности введения препарата крысы были разделены на три группы, которые получали морфин в течение 7, 14 и 21 дней. Контрольные животные получали внутрибрюшинно 0,9% раствор NaCl. Хроническая морфиновая интоксикация вызывает выраженное ингибирование пероксид-утилизирующего звена ферментативной антиоксидантной системы печени. Это создаёт условия для реализации токсического действия пероксида водорода и запуска цепных реакций ПОЛ. Однако низкий уровень конечных продуктов в ПОЛ, реагирующих с тиобарбитуровой кислотой (ТБК-РП), предполагает наличие некоего скэвэнджера H₂O₂, который блокирует пероксид-индуцированные свободнорадикальные процессы. Результаты экспериментов, проведенных *in vitro*, указывают на выраженную способность морфина к поглощению перекиси водорода. Однако в ситуации действия морфина *in vivo*, в качестве скэвэнджера активных форм кислорода помимо морфина способен выступать ещё и оксид азота.

Ключевые слова: хроническая морфиновая интоксикация, оксид азота, активные формы кислорода, печень.

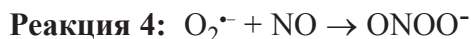
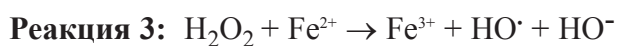
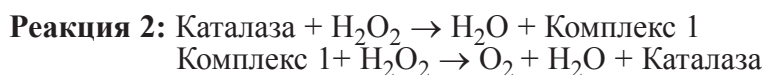
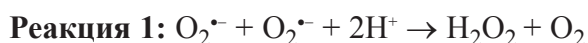
ВВЕДЕНИЕ. В процессе формирования опиатной наркомании на первый план выходят токсические эффекты морфина. Поступая в организм в токсических дозах, опиаты оказывают влияние на большинство органов и тканей, вызывая в них каскад изменений на молекулярном уровне [1]. Это влечёт за собой патохимические изменения в метаболизме клеток мишеней. Специфическое действие морфина обусловлено его взаимодействием с опиатными рецепторами (мю, каппа, дельта и др.) Другой аспект действия морфина – влияние на метаболизм в целом, и в том числе на интенсивность свободнорадикальных процессов (СРП). Влияние на течение СРП, сдвиг про/антиоксидантного баланса клетки в ту или иную сторону – один из важнейших путей влияния морфина на метаболизм. По современным представлениям, влияние СРП не ограничивается их потенциальной токсичностью, но и предполагает их участие в трансдукции сигнала [2]. Состояние процессов перекисного окисления липидов (ПОЛ) в

*Адресат для переписки

СВОБОДНОРАДИКАЛЬНЫЕ ПРОЦЕССЫ ПРИ МОРФИНОВОЙ ИНТОКСИКАЦИИ

условиях морфиновой интоксикации было детально описано Панченко и соавт. [3] и другими [4, 5]. Однако экспериментальные данные, полученные недавно другими исследователями [6], позволяют несколько расширить устоявшиеся представления о влиянии морфина на СРП. Активные формы кислорода (АФК) - определение используемое для описания различных молекул и свободных радикалов - производных молекулярного кислорода с одним неспаренным электроном. Продуктом одноэлектронного восстановления кислорода является супероксид анион ($O_2^{\bullet-}$) - предшественник многих АФК и медиатор цепи окислительных реакций. Дисмутация супероксида (она может происходить спонтанно или посредством реакции катализируемой супероксиддисмутазой, реакция 1) приводит к образованию перекиси водорода (H_2O_2), которая в свою очередь может быть полностью восстановлена до воды (реакция 2) или частично восстановлена до гидроксильного радикала (OH^{\bullet}) - одного из мощнейших оксидантов (реакция 3). Формирование гидроксил радикала катализируется восстановленными транзитными металлами, которые в процессе этой реакции окисляются. Затем они могут вновь быть восстановлены супероксидом, и цикл повторяется [7].

Кроме того, в процессе диффузии супероксид может реагировать с другими свободными радикалами в том числе и с оксидом азота (NO^{\bullet}) с образованием активных форм азота (АФА). Продукт данной реакции - пероксинитрит $ONOO^-$ имеет выраженные окислительные свойства (реакция 4)



Небольшие изменения концентрации оксидантов могут играть важную роль во внутриклеточной сигнализации, неконтролируемое же их увеличение может приводить к развитию цепных свободнорадикальных реакций. Мишенями этих реакций могут быть белки, ДНК, полисахариды, липиды [8]. Различные эндогенные химические и метаболические процессы в организме могут сопровождаться наработкой АФК и АФА. К таким процессам относятся интоксикации различной природы, в том числе и морфиновая. В опытах *in vitro* показано, что морфин обладает радикалперехватывающими свойствами (мощная восстанавливающая способность, способность улавливать супероксид радикал и перекись водорода, хелатировать ионы железа [6]). Однако сведения о его влиянии на СРП *in vivo* довольно противоречивы. Целью работы было изучение состояния ферментативного звена антиоксидантной системы и процессов ПОЛ в печени, в динамике развития хронической морфиновой интоксикации.

МЕТОДИКА. Эксперименты были выполнены на белых крысах самцах линии Wistar массой 180-190 гр.; животные получали внутривентриально 1% раствор морфина гидрохлорида, два раза в сутки. Доза наркотика постепенно увеличивалась: 10 мг/кг массы тела в течении 1-2 суток, 20 мг/кг - 3-4 сутки, затем 40 мг/кг начиная с 5 суток и до конца эксперимента. В зависимости от длительности введения препарата крысы были разделены на три группы, по 8 животных в каждой. Группа I - 7 суток, группа II - 14 суток и группа III - 21 сутки введения. Контрольные животные получали внутривентриально 0,9% раствор NaCl. Эвтаназию животных осуществляли путём декапитации. В эксперименте использовали печень и плазму крови. В центрифугатах гомогената печени (12000 g, 20 мин) определяли активность: супероксиддисмутазы (СОД)

(единицы активности/мин/мг белка) [9, 10], каталазы (КАТ) (мкмоль/мин/мг белка) [11], глутатионпероксидазы (ГПО) (нмоль/мин/мг белка) [12], глутатионредуктазы (ГР) (нмоль NADPH/мин/мг белка [13], а так же уровни: восстановленного глутатиона (GSH) (мкмоль/г ткани) [14], нитритов (NOx) (мкмоль/мл плазмы) [15], продуктов, реагирующих с тиобарбитуровой кислотой (ТБК-РП) (нмоль/г ткани) [16]. Полученные результаты были статистически обработаны при помощи пакета статистических программ Prism.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ. Анализируя полученные нами результаты (таблица), можно отметить, что, хроническая морфиновая интоксикация сопровождается активацией супероксиддисмутазы на седьмые (144% $p < 0,05$) и четырнадцатые сутки (156% $p < 0,1$) с нормализацией данного показателя на 21-е сутки эксперимента.

Таблица. Активность ферментов антиоксидантной системы, содержание ТБК-РП и глутатиона в печени и нитритов в плазме крови при хронической морфиновой интоксикации.

Показатель	Контроль	7 дней	14 дней	21 день
КАТ ¹	10,94±1,03	8,13±0,62*	6,78±1,04*	7,78±1,47*
СОД ²	125,0±16,9	180,1±12,3*	195,1±24,3#	156,9±9,6
ТБК-РП ³	14,3±2,4	10,3±1,4*	10,3±1,1*	12,8±1,1#
GSH ⁴	13,6±0,72	11,8±0,96*	8,2±0,25*	11,9±1,47*
ГР ⁵	34,2±4,1	33,1±4,0	25,4±2,2	30,1±3,8
ГПО ⁶	134,4±18,3	152,3±21,4	100,5±11,1*	92,5±9,7*
NOx ⁷	723,7±189,1	452,9±37,91	308,0±34,68*	342,3±63,36#

Примечание. Исследуемые показатели выражены: 1 - мкмоль/мин/мг белка; 2 - ЕД. активности/мин/мг белка; 3 - нмоль/г ткани; 4 - мкмоль/г ткани; 5 - нмоль NADPH/мин/мг белка; 6 - нмоль/мин/мг белка; 7 - мкмоль/мл. Значимость различий с контролем: *- $p < 0,05$; #- $p < 0,1$. В каждой группе было по 8 животных.

Введение морфина оказывало выраженное влияние на ферменты связанные с утилизацией пероксида водорода: КАТ и ГПО. Активность КАТ была снижена во все сроки введения морфина, а ГПО - на 14 и 21 сутки (58 и 55% соответственно). Уровень GSH был значительно ниже контрольного уровня во всех экспериментальных группах. Интенсивность процессов пероксидации липидов печени у животных всех экспериментальных групп была понижена. Концентрации NOx после двухнедельного и трехнедельного введения морфина были снижены (43% $p < 0,05$ и 47% $p < 0,1$ соответственно).

Активацию СОД на этапе 7 и 14 дней введения морфина косвенно подтверждают данные Sharp и соавт. [4] о стимуляции продукции супероксида опиоидными пептидами. СОД реакция сопровождается наработкой перекиси водорода, избыток которой в норме устраняется основными пероксид-утилизирующими ферментами - КАТ и ГПО. Ингибирование их активности (таблица) предполагает накопление значительного количества перекиси водорода после 7-ми дневной интоксикации где снижена только КАТ, и особенно после 14- и 21-дневной интоксикаций, где снижена активность обоих ферментов. Снижение уровня глутатиона, отмеченное нами выше, может быть объяснено, по мнению Skoulis и соавт. [17], действием морфина на мю-рецепторы, которые

СВОБОДНОРАДИКАЛЬНЫЕ ПРОЦЕССЫ ПРИ МОРФИНОВОЙ ИНТОКСИКАЦИИ

присутствуют не только в ЦНС но и в периферических тканях [18, 19]. Уменьшение доступности GSH- необходимого компонента ГПО реакции - одна из возможных причин снижения её интенсивности.

Многие эффекты морфина (анальгезия, толерантность и зависимость от него, регуляция желудочно-кишечного тракта и потребление пищи и т.п.) опосредуются изменением уровня оксида азота [20-23]. Ввиду сложности регуляции различных изоформ NO-синтазы и множественности эффектов морфина нет ясной и однозначной схемы его влияния на NO-синтазную систему, она предлагается лишь на уровне гипотез [24, 25]. Снижение концентрации NOx, помимо всего прочего, можно связать с тем, что окись азота способна принимать участие в терминеции индуцированных СРП реакций ПОЛ, т.е. обладать антиоксидантным действием [26]. Ингибирование ПОЛ, отмеченное нами выше, даёт основание предполагать, что в данном случае оксид азота может выступать в роли антиоксиданта, блокирующего процессы ПОЛ.

Многие физиологические и патофизиологические эффекты окиси азота опосредованы его взаимодействием с гуанилатциклазой, и как следствие, наработкой циклического 3'5'циклического гуанозинмонофосфата (сGMP) [27]. Другая, не менее важная часть эффектов NO, обусловлена действием молекулы как таковой. Понижение уровня NOx делает предпочтительным, по сравнению с эффектами опосредованными сGMP [28], реализацию прямых эффектов, присущих окиси азота. В их числе, взаимодействие с каталазой как железо-гемсодержащим протеином и S-нитрозилированию цистеиновых аминокислотных остатков в каталитическом центре ГПО. Так, по нашему мнению, ингибирование КАТ и ГПО отмеченное после 14 и 21 суток интоксикации, может быть следствием понижения уровня NOx в этих группах (рисунок).

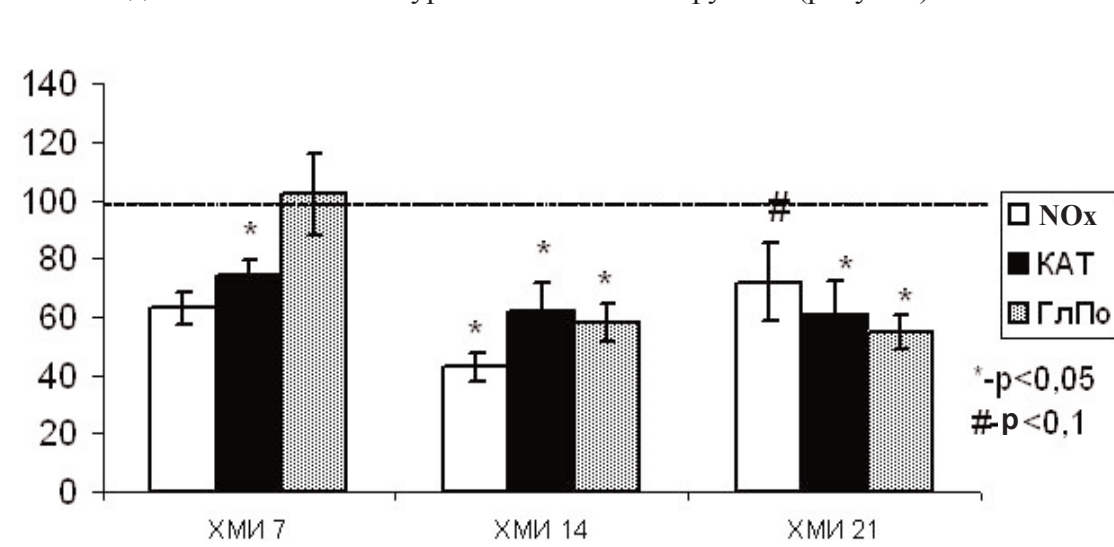


Рисунок.

Активность каталазы и глутатионпероксидазы в печени и содержание NOx в плазме крови крыс в условиях хронической морфиновой интоксикации (в % к контролю).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ. Обобщая сказанное выше, можно отметить, что хроническая морфиновая интоксикация на 7-й и особенно на 14 и 21 день, вызывает выраженное ингибирование пероксид-утилизирующего звена ферментативной антиоксидантной системы печени. Это создаёт условия для реализации токсичности перекиси водорода и запуска цепных реакций ПОЛ. Однако низкий уровень ТБК-РП, одного из конечных продуктов ПОЛ, предполагает наличие некоего скэвнджера H_2O_2 , который блокирует пероксид

индуцированные СРП. Уже упомянутые нами результаты экспериментов, проведенных *in vitro* [6], указывают на выраженную способность морфина к поглощению перекиси водорода. Однако в ситуации действия морфина *in vivo*, радикалперехватывающей способностью помимо морфина обладает ещё и оксид азота. Тем не менее, можно предположить, что морфин *in vivo* проявляет некоторое радикалперехватывающее действие. Но для выяснения степени и механизмов реализации этого действия требуются дальнейшие эксперименты.

ЛИТЕРАТУРА

1. Лелевич В.В., Селевич М.И., Панченко Л.Ф., Винницкая А.Г., Лелевич С.В. (1999) *Вопр. мед. химии*, **45**, 357-367.
2. Дубинина Е.Е. (2001) *Вопр. мед. химии*, **47**, 561-581.
3. Панченко Л.Ф., Пирожков С.В., Надеждин А.В., Усманова Н.Н. (1999) *Вопр. мед. химии*, **45**, 501-506.
4. Sharp B.M., Keane W.F. et al. (1985) *Endocrinology*, **117**, 793-795.
5. Zhou J., Si P., Ruan Z. et al. (2001) *Chin. Med. J. (Engl)*, **114**, 297-302.
6. İlhami Gülç, Sükrü Beydem H. et al. (2004) *Pharmacol. Res.*, **49**, 59-66.
7. Liochev S.I., Fridovich I. (1999) *IUBMB Life*, **48**, 157-161.
8. Stadtman E.R., Levine R.L. (2000) *Ann. N-Y Acad. Sci.*, **899**, 191-208.
9. Nishikimi M., Appaji N., Yagi K. (1972) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **46**, 849-854.
10. Rubbo H., Radi R., Trujillo M., Telleri R. et al. (1994) *J. Biol. Chem.*, **269**, 26066-26075.
11. Marklund S., Norderson I., Back O. (1984) *J. Gerontol.*, **36**, 405-409.
12. Круликова А., Штутман Ц.М. (1976) *Укр. биохим. ж.*, **48**, 223-228.
13. Хотимченко С.А., Алексеева И.А., Гвоздева Л.Т. и др. (1987) в сб.: "Теоретические и клинические аспекты науки о питании. Методы оценки обеспеченности населения витаминами", М, **8**, с. 107-109.
14. Sedlak J., Lindsay R. (1968) *Anal. Biochem.*, **25**, 192-205.
15. Huizenga J.R., Jansen P.L. (1995) *Clin. Chem.*, **41**, 892-896.
16. Oikawa M. et al. (1980) *Anal. Biochem.*, **95**, 351-358.
17. Skoulis N.P., James R.C. et al. (1989) *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **99**, 139-147.
18. Welters I.D., Menzebach A., Goumon Y., Langefeld T.W., Teschemacher H. (2000) *J. Neuroimmunology* **111**, 139-145.
19. Stefano G.B., Hartman A. et al. (1995) *J. Biol. Chem.*, **270**, 30290-30293.
20. Duarte I.D., Ferreira S.H. (1992) *Eur. J. Pharmacol.*, **221**, 171-174.
21. Majeed N.H., Przewlocka B., Machelska H., Przewlocki R. (1994) *Neuropharmacology*, **33**, 189-192.
22. Gyires K. (1994) *Eur. J. Pharmacol.*, **255**, 33-37.
23. Calignano A., Moncada S., DiRosa M. (1991) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **181**, 889-893.
24. Lanier R.K., Ijames S.G. (2002) *Drug Alcohol Depend.*, **66**, 225-233.
25. Панченко Л.Ф., Перегуд Д.И., Яковлев А.А. и др. (2004) *Биомед. химия*, **50**, 460-470.
26. Bloodsworth A., O'Donnell V.B., Freeman B.A. (2000) *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, **20**, 1707-1715.
27. Северина И.С. (2002) *Вопр. мед. химии*, **48**, 24-30.
28. Davis K.L., Martin E., Turko I.V., Murad F. (2001) *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, **41**, 203-236.

Поступила: 04. 10. 2005.

EFFECT OF CHRONIC MORPHINE TREATMENT ON FREE RADICAL STATE

D.A. Miskevich¹, N.E. Petushok¹, S.V. Lelevich², V.V. Lelevich¹, A.N. Borodinsky¹

¹Institute of Biochemistry, National Academy of Sciences, Grodno, BLK-50, 230017, Belarus;
tel.: +375 0152 337835; e-mail: dr.mengel@aport2000.ru

²Grodno Medical State University, Grodno, Gorkogo ul., 80, 230015, Belarus; tel.: +375 0152336679

The state of an enzymatic component of the antioxidant system, intensity of lipid peroxidation (LPO) in the liver, nitric oxide level in blood plasma were investigated in rats subjected to chronic morphine intoxication. Male Wistar rats were treated with intraperitoneal injections of 1% morphine hydrochloride twice a day. The daily dose of morphine was gradually increased from 10 mg/kg (1-2 days) to 20 mg/kg (3-4 days), and up to 40 mg/kg starting at the fifth day. The first group of animals (n = 8) received morphine injections for 14 and 21 days. Chronic morphine treatment was accompanied by marked inhibition of the peroxide-utilizing antioxidants in liver. This creates favourable conditions for H₂O₂ toxicity. However, low level of thiobarbituric acid reactive products suggests involvement of some scavenger, which inhibits hydrogen-peroxide induced free radical processes. *In vitro* experiments suggests that morphine may be involved into reduction of H₂O₂ level, whereas administration of morphine to rats may also employ nitric oxide as the scavenger of reactive oxygen species.

Key words: chronic morphine intoxication, nitric oxide, reactive oxygen species, liver.