

Влияние морфина на содержание метаболитов оксида азота в отделах мозга инбредных крыс линий WAG/Gsto и Fischer-344/N*

ПАНЧЕНКО Л.Ф.

академик РАН, д.м.н., профессор, рук. лаборатории биохимии Национального научного центра наркологии (ННЦН) МЗ РФ, Москва;

ПЕРЕГУД Д.И.

аспирант ННЦН МЗ РФ, Москва;

ПИРОЖКОВ С.В.

д.м.н., в.н.с. лаборатории биохимии ННЦН МЗ РФ, Москва;

ОНУФРИЕВ М.В.

к.б.н., с.н.с. лаборатории функциональной биохимии нервной системы Института высшей нервной деятельности и нейрофизиологии (ИВНД и НФ) РАН, Москва;

ГУЛЯЕВА Н.В.

д.б.н., профессор, рук. лаборатории функциональной биохимии нервной системы ИВНД и НФ РАН, Москва.

Проведено определение содержания метаболитов оксида азота, нитратов и нитритов (NO_x^-) в отделах мозга крыс инбредных линий WAG/Gsto и Fischer-344/N после однократного внутрибрюшинного введения раствора морфина гидрохлорида в дозе 30 мг/кг. Установлено, что исходное содержание NO_x^- в коре, стриатуме и среднем мозге выше у крыс линии Fischer-344/N в сравнении с WAG/Gsto. После введения морфина повышение уровня NO_x^- отмечено только у крыс линии WAG/Gsto в стриатуме и среднем мозге.

Введение

Оксид азота выполняет разнообразные функции в организме, такие, как регуляция сосудистого тонуса, микроциркуляции и гемостаза, неспецифическая иммунологическая защита, нейротрансмиссия, регуляция активности генов и ферментов. Эндогенным предшественником оксида азота является аминокислота L-аргинин. Реакцию образования оксида азота из L-аргинина катализирует фермент синтаза оксида азота (NOC), который представлен тремя изоформами: кальций-зависимыми конститутивными нейрональной (nNOC) и эндотелиальной (eNOC), и кальций-независимой индуцибельной (iNOC) [1]. В число конечных метаболитов оксида азота входят нитраты и нитриты (NO_x^-). Используя методы, позволяющие регистрировать их уровень, можно косвенно судить об интенсивности метаболизма оксида азота [2].

Многие фармакологические агенты, в том числе и морфин, способны влиять на метаболизм оксида азота. В частности, оксид азота опосредует эффекты острого и хронического действия морфина, такие, как анальгезия, толерантность, физическая зависимость и синдром отмены [3].

Крысы инбредных линий WAG/Gsto и Fischer-344/N достаточно полно охарактеризованы по поведенческим и фармакологическим показателям. Было показано, что крысы линии Fischer-344/N проявляют более высокий уровень тревожности [4]. Сравнительные исследования рецепторов основных нейромедиаторных систем мозга показали, что чувствительность серотониновых и дофаминовых рецепторов мозга существенно меньше у линии WAG/Gsto, чем у Fischer-344/N, а концентрация μ -опиатных и α_2 -адренорецепторов на синаптических мембранах нейронов у крыс линии WAG/Gsto значительно выше по сравнению с линией Fischer-344/N [5]. Исследования чувствительности данных линий к действию морфина показали, что крысы линии Fischer-344/N более склонны к внутривенному самовведению раствора морфина, а также

к добровольному потреблению раствора морфина в условиях свободного выбора между раствором морфина и водой [5]. Также было установлено, что анальгетический и депрессивный эффект морфина более выражен у крыс линии Fischer-344/N [6]. Учитывая, что оксид азота опосредует острые эффекты морфина [3], задачей работы была оценка интенсивности метаболизма оксида азота у крыс с различной чувствительностью к морфину и его изменения после введения морфина.

Материалы и методы

Эксперименты проведены на крысах-самцах инбредных линий Fischer-344/N и WAG/Gsto (Wistar Albino Glaxo) в возрасте 6 мес массой 250–300 г (питомник “Столбовая” РАН). Острую интоксикацию морфином моделировали однократным внутрибрюшинным введением раствора морфина гидрохлорида в дозе 30 мг/кг, контрольным животным вводили изотонический раствор хлорида натрия.

Животных декапитировали через 1, 2 и 4 ч после инъекции морфина. Из мозга подопытных животных на холоду были выделены следующие структуры: кора, стриатум, средний мозг, гиппокамп, гипоталамус, мозжечок и ствол мозга, после чего ткань замораживали и хранили до исследований при -40°C .

Ткань мозга гомогенизировали в буфере, содержащем 20 mM HEPES, 1 mM дитиотреитол, 0,5 mM ЭДТА, pH 7,5 (1:10 w/v). Гомогенат центрифугировали 30 мин при 13 000 об/мин. Для избавления от высокомолекулярных белков супернатант инкубировали 5 мин при 100°C , повторно центрифугировали 15 мин при 13 000 об/мин, полученный на данной стадии супернатант использовали для определения NO_x^- .

Для оценки метаболизма оксида азота использовали метод определения уровня стабильных метаболитов оксида азота, нитритов и нитратов (NO_x^-). Уровень нитритов определяли по интенсивности флюоресценции 2,3-диаминонафтотриазола, продукта реакции 2,3-диаминонафталлина (ДАН) и нитрита в кислой среде [7] с модификациями [8].

* Исследование частично поддержано грантом РФФИ № 02-04-49452, и грантом федеральной целевой программы “Интеграция науки и высшего образования России на 2002–2006 г.” № И 0566.

Для определения нитритов в супернатанте использовали нитритредуцирующую систему, содержащую конечные концентрации 125 мЕд/мл нитратредуктазы, 25 мкМ НАДФН и 25 мкМ ФАД, приготовленных в 20 мМ Трис-НСl-буфере pH 7,6. Для окисления НАДФН, содержащегося в среде, использовали систему лактатдегидрогеназы (ЛДГ)/пируват (1500 Ед/мл ЛДГ и 100 мМ пируват в соотношении 1:10).

К 20 мкл супернатанта добавляли 80 мкл нитритредуцирующей системы и инкубировали 30 мин при 37°C. Затем добавляли 11 мкл смеси ЛДГ/пируват, смесь инкубировали 10 мин при 37°C. Реакцию останавливали добавлением ледяной деионизированной воды, доводя объем до 200 мкл. Затем добавляли 20 мкл раствора ДАН и инкубировали 10 мин в темноте. Рабочий раствор ДАН готовили следующим образом: 31,6 мМ ДАН в диметилсульфоксиде, растворяли в 0,62 М НСl в соотношении 1:100. Реакцию образования 2,3-диаминонафтотриазола останавливали 100 мкл 280 мМ NaOH. Интенсивность флуоресценции измеряли на спектрофлуориметре Hitachi F-3000 при длине волны возбуждения 365 нм и эмиссии 405 нм. Для расчета концентрации NO_x^- в мозге был использован стандартный раствор нитрата натрия. Концентрация NO_x^- выражали в нмоль/мг белка.

Белок в супернатанте определяли по методу Брэдфорда [9]. Статистическую обработку данных проводили с использованием пакета программ Statistica 6.0 for Windows. Достоверность различий оценивали по t-критерию Стьюдента, результаты представлены в виде $M \pm S.E.M.$

Результаты исследования и их обсуждение

Базальный уровень NO_x^- в отделах мозга крыс линий Fischer-344/N и WAG/Gsto представлен на рис. 1. Сравнительный анализ показал, что у крыс линии Fischer-344/N этот показатель достоверно выше в коре, стриатуме и среднем мозге, чем в соответствующих областях мозга крыс WAG/Gsto.

У крыс линии WAG/Gsto наиболее значимые изменения под действием инъекции морфина наблюдались в стриатуме (рис. 2). В этом отделе отмечается длительное повышение уровня NO_x^- через 1–4 ч после инъекции мор-

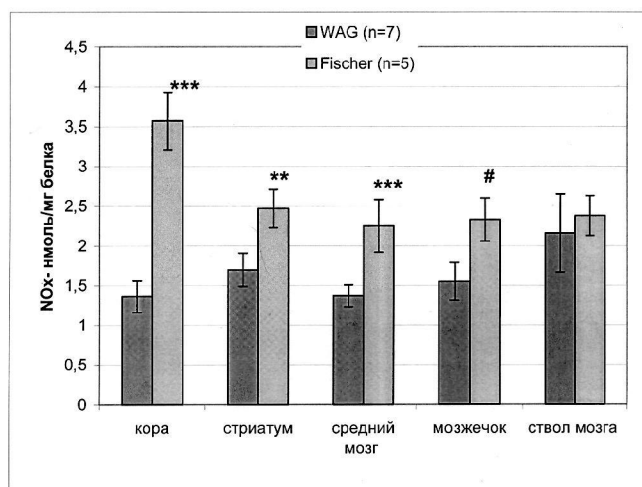


Рис. 1. Базальный уровень NO_x^- в отделах мозга инбредных крыс линий WAG/Gsto и Fischer-344/N:

*** — достоверность различий между линиями при $P < 0,02$; ** — при $P < 0,05$; # — при $P < 0,1$.

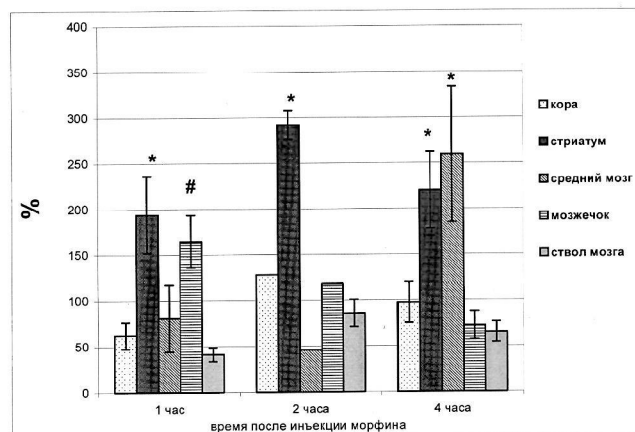


Рис. 2. Содержание NO_x^- (% от контроля) в отделах мозга крыс линии WAG/Gsto после однократного введения морфина (30 мг/кг):

* — достоверность отличий от контроля при $P < 0,02$; # — при $P < 0,1$.

фина. В среднем мозге наблюдали “отложенную” активацию системы NO (через 4 ч после введения морфина). В мозжечке отмечено повышение уровня NO_x^- через 1 ч на уровне тенденции ($P < 0,1$). У крыс линии Fischer-344/N заметных сдвигов содержания NO_x^- в мозге не обнаружено. В этой линии ни в одной из исследуемых областей мозга через 1, 2 и 4 ч после введения морфина не было зарегистрировано достоверного изменения уровня NO_x^- .

Ранее с помощью специальных тестов (открытое поле, норковая камера, темная и светлая камера, тест Фогеля и приподнятый крестообразный лабиринт) было установлено, что крысы линии Fischer-344/N имеют гораздо более высокий уровень тревожности, чем крысы линии WAG/Gsto [4]. Согласно нашим результатам, базальный уровень NO_x^- выше у крыс линии Fischer-344, что, возможно, связано с более высоким уровнем тревожности у этих крыс. Как известно, NO вносит определенный вклад в состояние тревоги у животных [10]. Показано, что введение 7-нитроиндазола (селективного ингибитора нейрональной синтазы оксида азота) оказывает анксиолитический эффект у крыс (в тесте на тревожность в крестообразном лабиринте) [10].

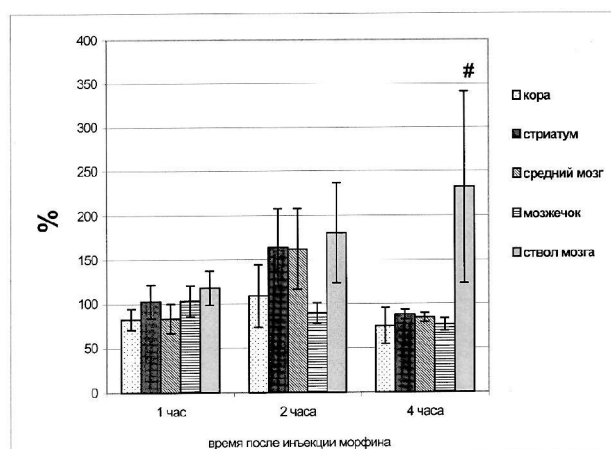


Рис. 3. Содержание NO_x^- (% от контроля) в отделах мозга крыс линии Fischer-344 после однократного введения морфина (30 мг/кг):

— достоверность отличий от контроля при $P < 0,1$.

Известно, что при однократном введении морфина повышается активность кальцийзависимой NOC в мозжечке мышей, а введение налоксона (антагониста опиатных рецепторов) предотвращало эффект морфина [11]. Согласно нашим результатам, введение морфина вызывало повышение уровня NO_x^- в стриатуме и среднем мозге, причем только у крыс линии WAG/Gsto. Поскольку известно, что у крыс линии WAG/Gsto концентрация μ -опиатных рецепторов в головном мозге выше, чем у крыс Fischer-344/N [5], то можно предположить, что различия в метаболизме NO у исследуемых линий связаны именно с различиями в концентрации опиатных рецепторов в мозге. Возможно, что повышение активности NOC и, как следствие, накопление стабильных метаболитов NO связаны с увеличением пула внутриклеточного кальция, который наблюдается при связывании морфина с соответствующими рецепторами [12]. К тому же морфин *in vitro* не влияет на активность NOC, что, возможно, также указывает на опосредованную рецептором активацию NOC морфином [13].

Ранее было показано, что введение ингибитора NOC нитроаргинина предотвращает развитие толерантности к действию морфина [14], что указывает на участие NO в формировании толерантности к действию опиоидов. Наши исследования показали, что изменения в уровне NO_x^- происходят у линии крыс, более толерантной к действию морфина. Этот факт также свидетельствует в пользу того, что оксид азота имеет отношение к регуляции устойчивости к морфину.

Список литературы

1. Moncada S., Palmer R.M.J., Higgs E.A. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology // *Pharmacol. Rev.* — 1991. — Vol. 43. — P. 109–142.
2. Archer S. Measurement of nitric oxide in biological models // *FASEB J.* — 1993. — Vol. 7. — P. 349–360.
3. Pataki I., Telegdy G. Further evidence that nitric oxide modifies acute and chronic morphine actions in mice // *Eur. J. Pharmacol.* — 1998. — Vol. 357. — P. 157–162.
4. Sudakov S.K., Medvedeva O.F., Rusakova I.V. et al. Differences in genetic predisposition to high anxiety in two inbred rat strains: role of substance P, diazepam binding inhibitor fragment and neuropeptide Y // *Psychopharmacology (Berl.)*. — 2001. — Vol. 154. — P. 327–335.
5. Борисова Е.В., Русаков Д.Ю., Судаков С.К. Различия характеристик опиатных и катехоламинергических рецепторов стриатума и коры головного мозга крыс линий Fischer-344 и WAG/Gsto могут обуславливать различия в положительно-подкрепляющем действии морфина // *Бюл. exper. биол. мед.* — 1992. — Т. 114. — С. 296–298.
6. Sudakov S.K., Goldberg S.R., Borisova E.V. et al. Differences in morphine reinforcement property in two inbred rat strains: associations with cortical receptors, behavioral activity, analgesia and the cataleptic effects of morphine // *Psychopharmacology (Berl.)*. — 1993. — Vol. 112. — P. 183–188.
7. Misko T.R., Schilling R.J., Salvemini D. et al. A fluorometric assay for the measurement of nitrite in biological samples // *Anal. Biochem.* — 1993. — Vol. 214. — P. 11–16.
8. Lei B., Adachi N., Nagaro T., Arai T. Measurement of total nitric oxide metabolite (NO_x^-) levels *in vivo* // *Brain. Res. Brain. Res. Protoc.* — 1999. — Vol. 4. — P. 415–419.
9. Bradford M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding // *Anal. Biochem.* — 1976. — Vol. 72. — P. 248–254.
10. Yildiz F., Ulak G., Erden B.F., Gacar N. Anxiolytic-like effects of 7-nitroindazole in the rat plus-maze test // *Pharmacol. Biochem. Behav.* — 2000. — Vol. 65. — P. 199–202.
11. Leza J.C., Lizasoain I., San-Martin-Clark O., Lorenzo P. Morphine-induced changes in cerebral and cerebellar nitric oxide synthase activity // *Eur. J. Pharmacol.* — 1995. — Vol. 285. — P. 95–98.
12. Harrison C., Smart D., Lambert D.G. Stimulatory effects of opioids // *Br. J. Anaesth.* — 1998. — Vol. 81. — P. 20–28.
13. Barjavel M.J., Bhargava H.N. Effect of opioid receptor agonists on nitric oxide synthase activity in rat cerebral cortex homogenate // *Neurosci. Lett.* — 1994. — Vol. 181. — P. 27–30.
14. Babey A.M., Kolesnikov Y., Cheng J. et al. Nitric oxide and opioid tolerance // *Neuropharmacology*. — 1994. — Vol. 33. — P. 1463–1470.

EFFECTS OF MORPHINE ON THE LEVELS OF NITRIC OXIDE METABOLITES IN BRAIN REGIONS OF INBRED STRAINS OF RATS WAG/GSTO AND FISCHER-344/N

- PANCHENKO L.F. Academician of RAMS, Doctor of Medical Sciences, Professor, Head of the Laboratory of Biochemistry, National Scientific Center of Addiction, Ministry of Public Health of Russian Federation;
- PEREGUD D.I. graduate student, National Scientific Center of Addiction, Ministry of Health of Russian Federation;
- PIROZHKOV S.V. Dr.med.sci., Leading Researcher, Laboratory of Biochemistry, National Scientific Center of Addiction, Ministry of Public Health of Russian Federation;
- ONUFRIEV M.V. PhD, Senior Researcher, Laboratory of Functional Biochemistry of the Nervous System, Institute of Higher Nervous Activity and Neurophysiology RAS;
- GULYAEVA N.V. Dr.biol.sci., Head of the Laboratory of Functional Biochemistry of the Nervous System, Institute of Higher Nervous Activity and Neurophysiology RAS.

The levels of nitric oxide metabolites, nitrates and nitrites (NO_x^-), were studied in different brain regions of two inbred strains of rats, WAG/Gsto and Fischer-344/N after single morphinehydrochloride administration (ip; 30 mg/kg). The basal levels of NO_x^- was higher in the neocortex, striatum, and midbrain of Fischer rats as compared with WAG. After morphine administration, an increase of NO_x^- was demonstrated in striatum and midbrain of WAG rats.