

Оксид азота и опи́йная наркомания: перспективы исследования

ПЕРЕГУД Д.И.
НАДЕЖДИН А.В.
ОНУФРИЕВ М.В.

н.с., лаборатория биохимии Национального научного центра наркологии (ННЦН) Росздрава, Москва
к.м.н., рук. отделения детской наркологии ННЦН Росздрава, Москва
к.б.н., с.н.с., лаборатория функциональной биохимии нервной системы
Института высшей нервной деятельности и нейрофизиологии (ИВНД и НФ) РАН, Москва
к.м.н., вед.н.с., отделение детской наркологии ННЦН Росздрава, Москва
д.м.н., профессор, академик РАМН, заслуженный деятель науки РФ,
рук. лаборатории биохимии ННЦН Росздрава, Москва
д.б.н., профессор, рук. лаборатории функциональной биохимии нервной системы ИВНД и НФ РАН, Москва

ТЕТЕНОВА Е.Ю.
ПАНЧЕНКО Л.Ф.

ГУЛЯЕВА Н.В.

Целью исследования стало изучение активности синтазы оксида азота (NOC) в тромбоцитах больных опи́йной наркоманией при поступлении в стационар (начало абстиненции), а также на 15-й и 30-й дни терапии. Показано, что значения исследуемого показателя у больных опи́йной наркоманией динамично изменялись. В связи с гетерогенностью динамики активности NOC в тромбоцитах у больных наркоманией выборка была разделена на две части. Активность NOC в тромбоцитах отрицательно коррелировала с выраженностью патологических проявлений синдрома отмены в группе больных, которые были старше по возрасту, употребляли преимущественно героин, имели большую давность заболевания и более высокий уровень суточной толерантности. Полученные результаты являются пилотными и рассматриваются как перспектива для дальнейших исследований с целью использования показателей системы оксида азота для объективизации состояния больных опи́йной наркоманией.

С момента выявления нейромедиаторной и нейромодуляторной функции оксида азота (NO) в нервной системе [18] проведено огромное число исследований, посвященных роли NO в развитии патологических состояний ЦНС, включая неврологические и психиатрические заболевания [17]. Особое внимание уделяется системе NO при решении проблем формирования наркологической патологии, развивающейся при злоупотреблении алкоголем, психостимуляторами, кокаином и опиатами [31]. Учитывая специфику распределения заболеваний химической зависимости в России, особенностью которой является то, что подавляющая доля заболеваний, связанных со злоупотреблением наркотиками, приходится именно на опи́йную наркоманию (около 90% от всех больных наркоманией) [3], особый интерес вызывает исследование роли NO именно в структуре патологического действия опиатов.

NO представляет собой газообразное соединение, которое образуется в подавляющем большинстве клеток млекопитающих и контролирует функционирование практически всех систем организма [22]. NO образуется внутриклеточно из незаменимой аминокислоты L-аргинина в реакции, катализируемой синтазой оксида азота (NO-синтаза, NOC), которая представлена конститутивными нейрональной и эндотелиальной изоформами (nNOC и eNOC) и индуцибельной изоформой (iNOC) [8]. NO — высокореактивное соединение, при метаболизме которого образуется большое число интермедиатов (нитропроизводные белков — нитротирозол, разнообразные оксиды азота, пероксинитрит, нитрозотиолы, нитрозоамины, комплексы с железом); эти реакции и обеспечивают многообразие физиологических функций NO [33]. Конечными продуктами окислительной дегградации NO являются анионы — нитриты и нитраты, суммарное содержание которых обозначается как NOx- [16].

В экспериментах на лабораторных животных показано, что NO опосредует следующие фармакологические

эффекты опиатов: анальгезию [23], изменения терморегуляции [30], анксиолизис [29], положительное подкрепление и формирование поведения самовведения опиатов [20, 25], развитие толерантности к фармакологическим эффектам опиатов [23, 26], развитие физической зависимости и манифестацию абстинентных расстройств [32]. Несмотря на имеющиеся представления о биологической роли NO в реализации тех или иных фармакодинамических свойств опиатов, система NO у больных опи́йной наркоманией остается недостаточно изученной. Несомненно, что исследование роли NO в механизме развития зависимости от опиатов у людей является одним из приоритетных направлений современной биологической и клинической наркологии, что, возможно, в будущем позволит создать новые медикаментозные средства, диагностические критерии, методы объективизации терапевтического процесса.

Исследования NO у больных опи́йной наркоманией проведены лишь в небольшом числе работ. Установлено, что у больных острым вирусным гепатитом В или хроническим гепатитом С, анамнез которых отягощен злоупотреблением наркотиков, скорость мочевой экскреции NOx- ниже, чем у людей, не принимающих наркотики [1]. Эти результаты, по мнению авторов, могут указывать на угнетение неспецифической защиты к инфекционным заболеваниям у людей, страдающих наркоманией [1].

У больных героиновой наркоманией по сравнению со здоровыми людьми обнаружено повышение концентрации NOx- в плазме крови, причем это увеличение прямо коррелирует с продолжительностью употребления героина и суточной дозой наркотика. Данный факт рассматривается как причина развития патологии внутренних органов в результате активации свободнорадикальных перекисных процессов [35, 36].

В работе [10] показано, что продукция NOx- интактными тромбоцитами больных опи́йной наркоманией как до ультрабыстрой детоксикации, так и после нее ниже,

чем у здоровых людей. При дополнительной стимуляции активности NOC в тромбоцитах с помощью интерлейкина-1 и липополисахарида (индукторы NOC) происходит еще большее снижение продукции NOx-, однако после детоксицирующей терапии данный показатель нормализуется. Эти данные были подкреплены дополнительными экспериментами, в которых проводили иммуноблоттинг на иNOC, и показали, что содержание иNOC в интактных тромбоцитах меньше у больных наркоманией [10]. Ссылаясь на то, что тромбоциты могут выступать в качестве экстрацеребральной модели нервных клеток, авторы предполагают, что NO вовлечен в центральные механизмы развития опиоидной наркомании.

Дюйезен и соавт. показали увеличение числа НАДФН-диафороза- (гистохимический маркер NOC) и иNOC-позитивных клеток, а также мРНК иNOC в голубом пятне больных героиновой наркоманией, умерших от передозировки наркотика; при этом авторы считают, что эти изменения имеют отношение к патогенезу заболевания [15]. Таким образом, проведенные исследования свидетельствуют о том, что при опиоидной наркомании показатели системы NO в разных системах организма изменяются по-разному, при этом такие сдвиги могут иметь отношение как к центральным механизмам заболевания, так и к соматическим последствиям злоупотребления опиатами.

Исследование метаболизма NO при различных патологических состояниях у людей (в нашем случае при опиоидной наркомании) ставит перед экспериментатором вопрос об адекватном выборе биоматериала для исследования и определяемого показателя. Определение концентрации NOx- в биологических жидкостях — плазме крови и моче — имеет небольшую клиническую значимость ввиду низкой специфичности показателя. Действительно, практически все типы клеток в организме млекопитающих способны синтезировать NO, к тому же существенный вклад в общее содержание NOx- вносят нитраты алиментарного происхождения [16]. При исследовании системы NO в ткани мозга *post mortem* результаты могут быть искажены развитием аноксических процессов в результате депрессии дыхательного центра, что и является причиной гибели при передозировке опиатами. Оптимальным объектом исследования, на наш взгляд, являются форменные элементы крови — клетки лейкоцитарного звена и тромбоциты. В клетках лейкоцитарного звена, в первую очередь в клетках, обладающих фагоцитарной активностью, конститутивно NOC не экспрессируется, но при воздействии таких индукторов, как провоспалительные цитокины, повышается активность иNOC [22]. В тромбоцитах конститутивно экспрессируется кальцийзависимая NOC [27]. Перечисленные факты, на наш взгляд, могут свидетельствовать о целесообразности определения активности NOC в тромбоцитах.

Таким образом, целью настоящей работы стало исследование кальцийзависимой активности NOC в тромбоцитах больных опиоидной наркоманией при поступлении в стационар, когда начинается манифестация абстинентных расстройств, а также на 15- и 30-й дни терапии.

Материалы и методы исследования

В исследование были включены 8 больных (7 мужчин и 1 женщина) опиоидной наркоманией (согласно МКБ-10), находящихся на стационарном лечении; средний возраст $23,4 \pm 4,1$ года. Контрольную группу составили 9 здоро-

вых добровольцев (5 мужчин и 4 женщины) аналогичной возрастной группы, не употреблявших опиаты (средний возраст $25,2 \pm 2,8$ года). Средний стаж систематического употребления опиатов — $6,4 \pm 3,0$ года, средняя суточная доза героина в последнее время перед госпитализацией составила $1,2 \pm 0,7$ г. Основным наркотиком, употребляемым больными, был героин, однако некоторые в сочетании с героином эпизодически употребляли другие препараты, проявляющие опиоидную активность: кодеин (терпинкод), и трамадол (трамал, залдиар), буторфанол (стадол).

Забор венозной крови проводили при поступлении, до начала основных терапевтических мероприятий, а также на 15- и 30-й дни терапии. Тяжесть состояния больных оценивали количественно или качественно по специфическим патофизиологическим и соматовегетативным расстройствам (бальная система). У всех больных клинические проявления абстинентного синдрома были расценены как средней тяжести. С целью купирования абстинентного синдрома больным назначалась стандартная терапия [5]: аминазин, феназепам, сонапакс. В качестве гипнотического средства назначался дономрил, при выраженных инсомнических расстройствах дополнительно применялись аминазин и галоперидол в сочетании с кордиамином. В случае, когда наблюдалось психомоторное возбуждение — аминазин или тизерцин в сочетании с кордиамином. Препараты, обладающие частичным агонистическим действием в отношении опиоидных рецепторов (трамадол), не назначались. В случае, когда наблюдались выраженные двигательные нарушения, обусловленные дефицитом экстрапирамидной системы, применялся холиноблокатор акинетон.

Тромбоциты из цельной крови выделяли, как описано в работе Chen и соавт. [13]. Цельную кровь больных героиновой наркоманией в объеме около 15 мл собирали в пробирки с 3,8%-ным раствором цитратом натрия (9:1). Для получения плазмы крови, обогащенной тромбоцитами, кровь центрифугировали 10 мин при 100 g (комнатная температура). Обогащенную тромбоцитами плазму аккуратно перенесли в другую пробирку и повторно центрифугировали 10 мин при 1500 g в присутствии ACD-буфера (0,8% лимонная кислота, 2,2% цитрат натрия, 2,4% глюкоза) (9:1). Полученный супернатант декантировали, а тромбоцитарную бляшку аккуратно суспендировали в среде выделения NOC (20 mM HEPES, pH 7,4, содержащий 1 mM дитиотрейтол, 1 mM фенилметилсульфонилфторид и 0,5 mM этилендиаминтетраацетат) и дважды лизировали в жидком азоте. До исследования образцы хранили при -80 C.

Общую активность NOC определяли радиометрическим методом по скорости накопления $[^3\text{H}]\text{-L-цитруллин}$ в реакции окисления $[^3\text{H}]\text{-L-аргинина}$, катализируемой NOC [12], в собственной модификации [6]. Для определения активности NOC в гомогенатах тромбоцитов реакцию инициировали добавлением исследуемого образца к 50 mM HEPES, pH 7,2, содержащего 10 мкКи/мл моногидрохлорид $[2,3,4,5\text{-}^3\text{H}]\text{-L-аргинина}$ (специфическая активность — 61,00 Ки (2,26 ТБк)/ммоль, Amersham Pharmacia Biotech, Великобритания), 1 mM CaCl₂, 5 мкМ флавинадениндинуклеотида, 5 мкМ флавиномононуклеотида, 1 mM никотинамидадинуклеотида фосфата восстановленного, 0,05 mM тетрагидробиоптерина и 10 мкг кальмодулина. После 60 мин инкубации образцы помещали в 0,3M-ный раствор хлорной кислоты, после чего освобождались от денатурированного белка посредством центри-

фугирования 10 мин при 3000 g. Затем нейтрализовали раствор добавлением 3M раствора K_2CO_3 , после чего пробы повторно при тех же параметрах центрифугировали для удаления осадка. Получившийся супернатант помещали на смолу DOWEX 50WX8-400 (Na^+ -форма) суспендированную в 20 mM HEPES, pH 7,4, содержащем 2 mM ЭГТА, для сорбции непрореагировавшего $[^3H]$ -L-аргинина. Радиоактивность $[^3H]$ -L-цитруллина в пробах после сорбции определяли на сцинтилляционном счетчике 1414 Winspectral, Wallac Oy, Финляндия. Активность фермента выражали в фитомолях накопленного $[^3H]$ -L-цитруллина на 1 мг белка в час. Концентрацию белка определяли по методу Bradford с использованием красителя Ку-масси голубого G-250 [11].

При расчете достоверности различий между двумя выборками применяли непараметрические методы, используя тест Крускала—Уоллиса и U-критерий Манна—Уитни (для независимых выборок), а также критерий Вилкоксона (для зависимых выборок). Корреляционный анализ проводили, рассчитывая r -коэффициент корреляции Спирмана. Данные представлены в виде среднего арифметического (M) \pm стандартное отклонение (SD).

Результаты исследования и их обсуждение

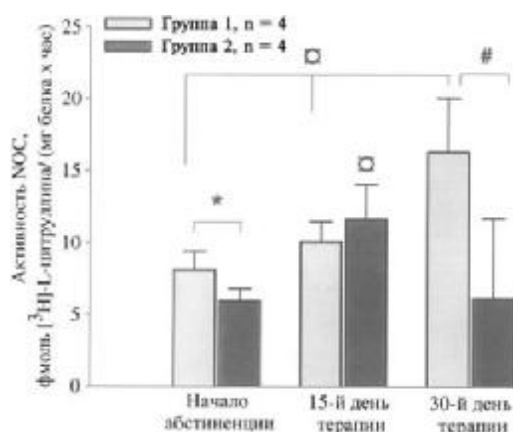
Установлено, что значения активности NOC в тромбоцитах больных опиоидной наркоманией при поступлении в стационар, а также в процессе стационарного лечения не отличаются от величины исследуемого показателя в контрольной группе (U-критерий Манна—Уитни), если сравнивать контрольную группу с усредненными значениями в группе больных. Так, активность NOC в тромбоцитах здоровых добровольцев составляет $10,68 \pm 6,29$ фмоль $[^3H]$ -L-цитруллина/(мг белка час), в то время как у больных опиоидной наркоманией при поступлении в стационар (начало абстиненции), а также на 15- и 30-й дни нахождения в стационаре активность фермента составляет $7,04 \pm 1,54$, $10,84 \pm 1,99$ и $11,22 \pm 6,98$ фмоль $[^3H]$ -L-цитруллина/(мг белка час), соответственно. При этом, на 15- и 30-й дни терапии значения активности NOC достоверно выше, чем при поступлении в стационар ($p = 0,012$; $p = 0,093$, соответственно, критерий Вилкоксона).

Оказалось, что динамика активности NOC в тромбоцитах больных опиоидной наркоманией не одинакова у разных больных, в связи с чем вся выборка была разделена на две части (рисунок). У половины больных ($n=4$) отмечено линейное повышение исследуемого показателя с 1-го по 30-й день терапии — группа 1, в то время как у другой половины ($n=4$) на 15-й день терапевтических мероприятий активность NOC имеет максимальные значения в сравнении с другими временными точками — группа 2. При этом в группе 1 на уровне тенденции ($p=0,068$, критерий Вилкоксона) выявляется повышение активности NOC в процессе лечения, при этом величина показателя в каждый из исследуемых дней лечения достоверно отличается от показателей в двух других временных точках (рисунок). При этом, по тесту Крускала—Уоллиса, значения активности NOC в группе 1 также достоверно повышаются с увеличением длительности терапии ($H(2, N=12)=8,77$, $p = 0,012$). Более того, на 30-й день терапии в группе 1 активность фермента выше, чем в контрольной группе ($p = 0,089$, U-критерий Манна—Уитни) — активность NOC в контрольной группе — $10,68 \pm 6,29$, а в группе 1 на 30-й день терапии — $16,30 \pm 3,75$ фмоль $[^3H]$ -L-цитруллина/(1 мг белка час). В группе 2 наблю-

дается пик активности NOC на 15-й день терапии, который на уровне тенденции ($p = 0,089$, критерий Вилкоксона) отличается от значений активности NOC при поступлении на лечение и после 30 дней терапии. Исходно при поступлении на лечение значения активности NOC в указанных группах достоверно различаются: в группе 1 данный показатель был выше, чем в группе 2 ($p = 0,021$, U-критерий Манна—Уитни), а на 30-й день терапии исследуемый показатель различается в выделенных группах на уровне тенденции ($p = 0,083$, U-критерий Манна—Уитни).

По-видимому, активность NOC и характер ее изменения в процессе лечения в тромбоцитах больных опиоидной наркоманией зависит от таких факторов, как вид и доза употребляемого наркотика, а также стаж наркотизации; на это может указывать различие указанных параметров в группах 1 и 2. Так, оказалось, что выделенные на основании характера изменений активности NOC группы больных опиоидной наркоманией (группы 1 и 2) различаются по среднему возрасту ($26,0 \pm 2,9$ и $20,8 \pm 3,5$ года соответственно, $p = 0,083$, U-критерий Манна—Уитни), стажу наркотизации ($8,3 \pm 2,9$ и $4,5 \pm 1,9$ года соответственно, $p = 0,083$, U-критерий Манна—Уитни) и суточной дозе потребляемого героина ($1,8 \pm 0,6$ и $0,7 \pm 0,4$ г соответственно, $p = 0,043$, U-критерий Манна—Уитни). Кроме того, группу 1 составили больные, которые преимущественно употребляют героин, в то время как больные группы 2 помимо героина употребляли другие препараты, обладающие опиоидной активностью, такие, как кодеин (терпинкод), трамадол (трамал, залдиар) и буторфанол (стадол). Можно предположить, что исходное различие активности NOC в группах 1 и 2 (при поступлении в стационар) связано с тем, что в группе 2 больные в сочетании с героином употребляли опиоиды, несколько отличные по спектру фармакологической активности.

Помимо опиоидных препаратов двое из четырех больных группы 2 принимали психостимуляторы без признаков зависимости от них, в группе 1 один пациент потреблял препараты конопли. В группе 2 отмечается наследственная отягощенность болезнями зависимости (алкоголизм у кровных родственников) у всех больных, в группе 1 — только у половины. В группе 1 все больные являются положительными по антигену вируса гепатита С, в группе 2 — только половина. Важно отметить, что, в от-



Активность NOC в тромбоцитах больных опиоидной наркоманией. Достоверность различий между группами: * — $p = 0,021$, # — $p = 0,083$ (U-критерий Манна—Уитни); достоверность различий внутри групп (от двух остальных временных точек): α — $p = 0,068$ (критерий Вилкоксона).

личие от группы 1, трое из пациентов группы 2 с целью купирования двигательных расстройств связанных с нарушением функционирования экстрапирамидной системы в дополнение к стандартной терапии получали холинблокаторы (акинетон). Также не исключено, что различие динамики изменений активности NOC в группах 1 и 2 обусловлено некоторым различием используемых медикаментозных средств.

Кроме того, активность NOC в тромбоцитах больных опишной наркоманией, вошедших в группу 1, обнаруживает обратную корреляцию с выраженностью патологических проявлений синдрома отмены (соматовегетативные и психопатологические нарушения, суммарный бал) ($n = 12$, $r = -0,80$, $p = 0,002$), а в группе 2 эти корреляционные отношения отсутствуют ($n = 12$, $r = 0,43$, $p = 0,162$).

Таким образом, группа 1, в отличие от группы 2, представлена относительно взрослыми больными, употребляющими преимущественно героин, с большим стажем наркотизации и более высоким уровнем суточной толерантности.

На плазматической мембране тромбоцитов и нейронов экспрессируются одинаковые рецепторы и протекают схожие биохимические процессы, поэтому существует мнение, что тромбоциты можно использовать как экстрацеребральную модель нервных клеток в исследованиях нарушений физиологической активности ферментов при неврологических и психиатрических заболеваниях [2, 10]. Наряду с другими нейрональными системами, нарушения нитригической системы могут составлять центральные звенья патогенеза опишной наркомании [31]. Можно предположить, что уровень активности NOC в тромбоцитах при опишной наркомании с определенной долей приближения может отражать реакцию нитригических нейронов в некоторых структурах головного мозга. Необходимо особо подчеркнуть, что речь идет именно о некоторых структурах головного мозга, поскольку известно, что показатели нитригической системы (активность NOC, концентрация NOx-, концентрация белка и мРНК NOC) по-разному изменяются в разных отделах центральной нервной системы при синдроме отмены опиатов у лабораторных животных [7, 9, 14, 19, 34].

С другой стороны, зарегистрированные изменения активности NOC в тромбоцитах, возможно, не имеют прямого отношения к процессам, протекающим в центральной нервной системе. Они могут представлять собой компоненты патогенетических процессов, приводящих к развитию патологии самих тромбоцитов и нарушению их функций, а также опосредующих эндотелиальную и сосудистую дисфункцию. Так, показано, что при героиновой наркомании может развиваться тромбоцитопения и тромбоцитопеническая пурпура [28], причиной которых могут быть выявленные нами нарушения активности NOC.

В любом случае, согласно стандартам GCP (Good Clinical Practice — надлежащая клиническая практика) необходимым компонентом оценки результатов в клинических исследованиях в медицине, и, в частности, в наркологии является объективизация клинических данных лабораторными методами исследования [4]. При отсутствии регулярного контроля ремиссии биохимическими методами информацию о ремиссии нельзя рассматривать как достоверную [4]. Исходя из этого и учитывая, что активность NOC в тромбоцитах коррелирует с состоянием пациентов, оценку системы оксида азота у больных опишной наркоманией можно рассматривать в качестве кандидата для возможных стандартизированных лабораторных

исследований при контроле эффективности терапевтических мероприятий.

Как направление будущих исследований системы NOC у больных опишной наркоманией целесообразно отметить перспективность изучения некоторых ее параметров. К ним можно отнести:

- полиморфизм гена нейрональной NOC в популяции здоровых людей и людей, страдающих наркоманией,
- содержание мРНК и белка NOC в форменных элементах крови,
- активность NOC в разных типах клеток крови,
- оценку содержания продуктов метаболизма оксида азота, таких, как нитрозотиолы, нитрозоамины, нитротриозол в спинномозговой жидкости.

Таким образом, результаты настоящей работы показали, что активность NOC в тромбоцитах исследованной выборки больных опишной наркоманией в ходе терапии изменяется гетерогенно, и, возможно, зависит от таких факторов, как вид употребляемого опиата, стаж наркотизации, суточная толерантность и спектр получаемых медикаментов. Предполагается, что в будущем возможно использование показателей системы оксида азота у больных опишной наркоманией при проведении стандартных лабораторных исследований.

Список литературы

1. Виноградов Н.А., Журавлева И.А., Максимова Р.Ф. Синтез монооксида азота при парентеральных гепатитах у наркоманов// Тезисы "V съезд общества гастроэнтерологов России и XXXII сессии научно-исследовательского института гастроэнтерологии", Москва, 3–6 февраля 2005 г. - М.: Анахарсис, 2005. — В15. — С. 214–215.
2. Зозуля А.А. Перспективы использования форменных элементов крови как экстрацеребральную модель для изучения рецепторов в центральной нервной системе (обзор)// Ж. невропатол. психиатр. им. С.С. Корсакова — 1986. — Т. 86. — С. 599–603.
3. Козлов А.А., Перельгин В.В., Чиквина А.Г. Ситуация с героиновой наркоманией в Российской Федерации. // Наркология. — 2005. — № 11. — С. 31–36.
4. Крупицкий Е.М., Борцов А.В. Парадигма доказательной медицины: принципы проведения клинических исследований в наркологии// Вопросы наркологии. — 2005. — №6. — С. 3–15.
5. Надеждин А.В., Литвинова С.В., Тетенова Е.Ю., Михалев И.В. К вопросу о механизмах эффективности налоксона гидрохлорида в комплексном лечении героиновой наркомании// Наркология. — 2005. — №8. — С. 48–51.
6. Онуфриев М.В., Семенова Т.П., Колаева С.Г., Моисеева Ю.В., Егорова Л.К., Гуляева Н.В. Активность синтазы оксида азота в отделах мозга сусликов *Citellus Undulatus* в разных фазах гibernационного цикла// Нейрохимия. — 2002. — Том.19. — С. 264–268.
7. Перегуд Д.И., Онуфриев М.В., Яковлев А.А., Степанчиков М.Ю., Лазарева Н.А., Павлова Т.В., Панченко Л.Ф., Гуляева Н.В. Активность синтазы оксида азота и концентрация нитратов/нитритов в отделах головного мозга крыс при спонтанном синдроме отмены морфина// Биомедицинская химия. — 2006.
8. Alderton W.K., Cooper C.E., Knowles R.G. Nitric oxide synthase: structure, function and inhibition// *Biochem. J.* — 2001. — Vol. 357. — P. 593–615.
9. Babey A.M., Kolesnikov Y., Cheng J., Inturrisi C.E., Trifillett R.R., Pasternak G.W. Nitric oxide and opioid tolerance// *Neuropharmacology.* — 1994. — Vol. 33. — P. 1463–1470.
10. Batista A., Macedo T., Tavares P., Ribeiro C.F., Relvas J., Gomes P., Ramalheira C., Botto I., Vale L., Ferreira L., Guete O., Ruiz G. // Nitric oxide production and nitric oxide synthase expression in platelets from heroin abusers before and after ultrarapid detoxification. // *Ann. N. Y. Acad. Sci.* — 2002. — Vol. 965. — P. 479–486.
11. Bradford M. M. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein using the principle of protein binding. // *Anal. Biochem.* — 1976. — Vol. 72. — P. 248–254.

12. Bredt D.S., Snyder S.H. Nitric oxide mediates glutamate-linked enhancement of cGMP levels in the cerebellum. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* — 1989. — Vol. 86. — P. 9030—9033.
13. Chen L., Salafranca M.N., Mehta J.L. Cyclooxygenase inhibition decreases nitric oxide synthase activity in human platelets. // *Am. J. Physiol. (Heart Circ. Physiol.)*. — 1997. — Vol. 273. — P. H1854—H1859.
14. Cuellar B., Fernandez A.P., Lizasoain I., Moro M.A., Lorenzo P., Bentura M.L., Rodrigo J., Leza J.C. Up-regulation of neuronal NO synthase immunoreactivity in opiate dependence and withdrawal. // *Psychopharmacology*. — 2000. — Vol. 148. — P. 66—73.
15. Dyuzhen I.V., Kurbatskii R.A., Dirlam G.G., Kozhemyako V.B., Zavgorodnyaya M.S. Inducible nitric oxide synthase in the locus coeruleus of human opiate addicts. // *Eur. Neuropsychopharmacol.* — 2005. — Vol. 15. (Suppl. 2.) — P. S295.
16. Ellis G., Adatia I., Yazdanpanah M., Makela S. Nitrite and nitrate analyses: a clinical biochemistry perspective. // *Clin. Biochem.* — 1998. — Vol. 31. — P. 195—220.
17. Esplugues J.V. NO as a signalling molecule in the nervous system. // *Br. J. Pharmacol.* — 2002. — Vol. 135. — P. 1079—1095.
18. Garthwaite J. Glutamate, nitric oxide and cell-cell signaling in the nervous system. // *TINS*. — 1991. — Vol. 14. — P. 60—67.
19. Kumar S., Bhargava H. Time course of the changes in central nitric oxide synthase activity following chronic treatment with morphine in the mouse: reversal by naltrexone. // *Gen. Pharmacol.* — 1997. — Vol. 29. — P. 223—227.
20. Manzanedo C., Aguilar M.A., Rodriguez-Arias M., Navarro M., Minarro J. 7-Nitroindazole blocks conditioned place preference but not hyperactivity induced by morphine. // *Behav. Brain Res.* 2004. — Vol. 150. — P. 73—82.
21. Miranda K.M., Espey M.G., Wink D.A. A rapid, simple spectrophotometric method for simultaneous detection of nitrite and nitrate. // *Nitric oxide: Biol. Chem.* — 2001. — Vol. 5. — P. 62—71.
22. Moncada S., Palmer R.M.J., Higgs E.A. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. // *Pharmacol. Rev.* — 1991. — Vol. 43. — P. 109—142.
23. 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.
24. Rahman S., Ali Khan R., Kumar A. Experimental study of the morphine de-addiction properties of Delphinium denudatum Wall. // *BMC Compl. Alt. Med.* — 2002. — Vol. 2. — P. 6.
25. Sahraei H., Poorheidari G., Foadaddini M., Khoshbaten A., Asgari A., Noroozadeh A., Ghoshooni H., Firoozabadi S.H., Zarrindast M.R. Effects of nitric oxide on morphine self-administration in rat. // *Pharmacol. Biochem. Behav.* — 2004. — Vol. 77. — P. 111—116.
26. Santamarta M.T., Ulibarri I., Pineda J. Inhibition of neuronal nitric oxide synthase attenuates the development of morphine tolerance in rats. // *Synapse*. — 2005. — Vol. 57. — P. 38—46.
27. Sase K., Michel T. Expression of constitutive endothelial nitric oxide synthase in human blood platelets. // *Life Sci.* — 1995. — Vol. 57. — P. 2049—2055.
28. Savona S., Nardi M.A., Lennette E.T., Karpatkin S. Thrombocytopenic purpura in narcotics addicts. // *Ann. Intern. Med.* — 1985. — Vol. 102. — P. 737—741.
29. Shin I.C., Kim H.C., Swanson J., Hong J.T., Oh K.W. Anxiolytic effects of acute morphine can be modulated by nitric oxide systems. // *Pharmacology*. — 2003. — Vol. 68. — P. 183—189.
30. Ulugol A., Dost T., Dokmeci D., Akpolat M., Karadag C.H., Dokmeci I. Involvement of NMDA receptors and nitric oxide in the thermoregulatory effect of morphine in mice. // *J. Neural. Transm.* — 2000. — Vol. 107. — P. 515—521.
31. Uzbaya I.T., Oglesby M.W. Nitric oxide and substance dependence. // *Neurosci. Biobehav. Rev.* — 2001. — Vol. 25. — P. 43—52.
32. Vapuel D.B., Kimes A.S., London E.D. Further in vivo studies on attenuating morphine withdrawal: isoform-selective nitric oxide synthase inhibitors differ in efficacy. // *Eur. J. Pharmacol.* — 1997. — Vol. 324. — P. 11—20.
33. Wink D.A., Mitchell J.B. The chemical biology: insights into regulatory, cytotoxic cytoprotective mechanisms of nitric oxide. *Free Radic. Biol. Med.* 1998. Vol. 25. P. 434—456.
34. Zhang G.H., Wang B.J., Wu X. Study on the changes of ncNOS in chronic heroin dependence and spontaneous withdrawal in rats. // *Fa. Yi. Xue. Za. Zhi.* — 2003. — Vol. 19. — P. 68—71.
35. Zhou J.F., Yan X.F., Ruan Z.R., Peng F.Y., Cai D., Yuan H., Sun L., Ding D.Y., Xu S.S. Heroin abuse and nitric oxide, oxidation, peroxidation, lipoperoxidation. // *Biomed. Environ. Sci.* — 2000. — Vol. 13. — P. 131—139.
36. Zhou J., Si P., Ruan Z., Ma S., Yan X., Sun L., Peng F., Yuan H., Cai D., Ding D., Xu S. Primary studies on heroin abuse and injury induced by oxidation and lipoperoxidation // *Chin. Med. J. (Engl.)*. — 2001. — Vol. 114. — P. 297—302.

NITRIC OXIDE AND OPIATE ADDICTION: THE INVESTIGATION PERSPECTIVES

PEREGUD D.I.	Researcher, Laboratory of the Biochemistry, National Research Center on Addictions, Ministry of Health and Social Development of Russia, Moscow
NADEZHGIN A.V.	Cand. med. sci., Head of the Children's Addictions Department, National Research Center on Addictions, Ministry of Health and Social Development of Russia, Moscow
ONUFRIEV M.V.	Cand. biol. sci., Senior Researcher, Laboratory of Functional Biochemistry of the Nervous System, Institute of Higher Nervous Activity and Neurophysiology, Russian Academy of Sciences, Moscow
TETENOVA E.YU.	Cand. med. sci., Leading Researcher, Children's Addictions Department, National Research Center on Addictions, Ministry of Health and Social Development, Moscow
PANCHENKO L.F.	Dr. med. sci., Professor, Academician of RAMS, Head of the Laboratory of Biochemistry, National Research Center on Addictions, Ministry of Health and Social Development, Moscow
GULYAEVA N.V.	Dr. biol. sci., Professor, Head of the Laboratory of Functional Biochemistry of the Nervous System, Institute of Higher Nervous Activity and Neurophysiology, Russian Academy of Sciences, Moscow

Nitric oxide synthase (NOS) activity was investigated in platelets of human opiate addicts and control subjects. Measurement of NOS activity was performed on the first day (beginning of the opiate withdrawal syndrome) as well as 15th and 30th day of therapy. NOS activity in the platelets heterogeneously changed in the opiate addicts suggesting that this group could be divided into two sub groups. A negative correlation of NOS activity in the platelets and clinical manifestations of withdrawal syndrome was observed in the sub group representing older patients, predominantly abused by heroin, with longer addiction history and higher level of daily tolerance. The results of this pilot study form a basis for further investigations on the involvement of nitrergic system in the pathogenesis of opiate addiction.