

УДК 547.015+615.212.7.015.15.015.4

НЕЙРОМЕДИАТОРНЫЕ НАРУШЕНИЯ В МОЗЖЕЧКЕ И СТВОЛЕ ГОЛОВНОГО МОЗГА КРЫС ПРИ ХРОНИЧЕСКОЙ МОРФИНОВОЙ ИНТОКСИКАЦИИ

С.В. Лелевич¹, к.м.н.; В.В. Лелевич¹, д.м.н., профессор; А.А. Новокшионов²

1 – УО «Гродненский государственный медицинский университет»

2 – ГНУ «Институт биохимии НАН Беларуси», Гродно, Беларусь

Изучено влияние хронической морфиновой интоксикации на состояние дофаминергической, норадренергической, серотонинергической нейромедиаторных систем и уровень ГАМК в стволе и мозжечке головного мозга крыс. Наиболее выраженные нейромедиаторные нарушения при этом выявлены в стволе на 14 сутки морфинизации. Это проявляется падением уровня дофамина, норадреналина и серотонина. В мозжечке отмечено увеличение концентрации ГАМК на 7 и 14 сутки хронической морфиновой интоксикации.

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

The effects of chronic morphine intoxication on the functioning of dopaminergic, noradrenalinergic, serotonergic systems, and GABA level in the brain stem and the cerebellum of rat brain have been studied. Thus the most prominent neuromediator disorders have been revealed in the brain stem on the 14th day of morphine intoxication. It is manifested by a falling level of dopamine, noradrenaline and serotonin. The increase in concentration of GABA in the cerebellum on the 7th and 14th days of chronic morphine intoxications has been noted.

Key words: morphine, brain, dopamine, serotonin, GABA.

Введение

Важную роль в формировании зависимости от наркотиков играет их специфическое влияние на определенные структуры головного мозга, что приводит к развитию синдрома зависимости, который является ведущим в клинической картине наркологических заболеваний [1]. Не вызывает сомнений, что опиаты, в частности, морфин, обладая выраженным наркогенным потенциалом, воздействуют химическим путем на систему подкрепления, активируя тем самым ее функционирование и влияя на метаболизм ряда нейромедиаторов [7, 8].

Воздействие морфина на ЦНС приводит к интенсивному выбросу из депо катехоламинов, в частности, дофамина, что сопровождается возбуждением системы подкрепления [1]. Повторный прием опиатов вызывает истощение запасов нейромедиаторов, что, в конечном итоге, несколько ингибирует деятельность данной системы. Клинически это проявляется эмоциональным дискомфортом, вялостью, депрессивными симптомами [7]. Прием наркотика на этом фоне вызывает дополнительное высвобождение нейромедиаторов из депо, что временно нормализует деятельность лимбических структур головного мозга. Однако достаточно быстро свободные катехоламины разрушаются, и их уровень снова падает. Развивается поведение, направленное на поиск и употребление наркотика [8]. Этот «порочный круг» лежит в основе формирования психической зависимости от наркотических препаратов, являющейся одним из основных признаков наркомании.

Выявлены нарушения функционирования ряда нейромедиаторных систем головного мозга крыс при хронической морфиновой интоксикации [8]. При этом отмечается важная роль дофаминергической системы в опосредовании эффектов наркотика, а также участие в этих процессах серотонинергической и ГАМК-ергической нейромедиаторных структур. Полагают [7], что определенную роль в вышеуказанных нарушениях играют изменения активностей основных регуляторных систем – аденилатциклазной, протеинкиназной, а также уровня G-белка при длительном воздействии агонистов опиоидных рецепторов. Важную роль при этом играют эндогенные опиаты пептидной и не пептидной природы, серотонинергические синапсы и аминокислотные нейро-

медиаторные системы. Необходимо также учитывать корреляцию нейрохимических процессов в ЦНС и их региональную специфику со сроками наркотизации [5].

Для выяснения участия отдельных нейромедиаторных систем в формировании патохимической картины хронической морфиновой интоксикации было выполнено определение уровней ряда нейромедиаторов и их метаболитов в мозжечке и стволе головного мозга крыс при длительном введении морфина гидрохлорида.

Материалы и методы

Опыты выполнены на 32 белых беспородных крысах-самцах массой 180-200 г. Животные содержались на стандартном пищевом рационе вивария при свободном доступе к воде. Воспроизведение модели хронической морфиновой интоксикации проводили, исходя из имеющихся аналогов [8, 9].

Экспериментальным животным внутрибрюшинно (в/б) вводили 1 % раствор морфина гидрохлорида в течение 7 сут (2-я группа), 14 сут (3-я группа) и 21 сут (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 сутки – 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 мозжечок 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 RheoLyne 7125 и амперометрического детектора M460 (Waters Assoc., США) [8, 9].

Определение биогенных аминов и их метаболитов проводили методом ион-парной ВЭЖХ: колонка Сепарон SGX C₁₈, 5мкМ, 3x15 мМ (Элсико, Россия); подвижная фаза: 0,1 М КН₂РО₄; 17 мМ СН₃СООН; рН 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 [10]. Калибровка осуществлялась с помощью смеси стандартов, содержащей 100 мкМ Туг, 10 мкМ Тгр и 1 мкМ остальных веществ.

Определение ГАМК проводили методом обращенно-фазной хроматографии после предколонной дериватизации с О-фталевым альдегидом и β-меркаптоэтанолом с изократическим элюированием и детектированием по флуоресценции на той же хроматографической системе с детектором флуоресценции М 420 (Waters Assoc., США) [6].

Прием и обработка хроматограмм осуществлялась с помощью программно-аппаратного комплекса «Мульти-Хром-1», обработка хроматограмм – по методу внутреннего стандарта.

Статистическую обработку данных проводили с использованием параметрических методов, применяя *t*-критерий Стьюдента, при помощи пакета статистических программ Statistika 6.0.

Результаты и обсуждение

Хроническая морфиновая интоксикация формирует в организме специфическую функциональную систему, одним из результатов действия которой является получение положительного эмоционального подкрепления [7, 8]. Длительное введение наркотиков сопровождается метаболическими нарушениями, выступающими одной из основных причин формирования патологической системы потребления наркотического вещества. В состоянии зависимости, концентрация волевого усилия, направленного на получение и употребление наркотика, достигает полярной степени и, в конечном итоге, подчиняет себе другие естественные мотивации.

Введение морфина в течение 7 сут сопровождается снижением содержания дофамина (на 27 %) и норадреналина (на 39 %) в стволе головного мозга (табл. 1). При этом отмечается повышение уровня их метаболитов – 3,4-диоксифенилуксусной и гомованилиновой кислот. Недельное назначение морфина не изменяет в данном регионе мозга содержания компонентов серотонинергической системы, а уровень ГАМК статистически значимо увеличивается в сравнении с контролем. Известно, что в стволовой части мозга локализуется «система подкрепления», участвующая в регуляции мотиваций и эмоционального состояния. Ее важным элементом являются катехоламины [10]. При повторном потреблении морфина запас нейромедиаторов из депо постоянно истощается, что, в конечном итоге, влечет за собой развитие дефицита этих компонентов.

В мозжечке при 7-суточном введении морфина отмечается статистически значимое увеличение уровней гомованилиновой и 5-оксииндолуксусной кислот, а также ГАМК, тогда как содержание дофамина и норадреналина остается неизменным (табл. 2). Увеличение концентрации ГАМК в стволе и мозжечке указывает на превалирова-

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

Показатель	Г р у п п а			
	I Контроль	II 7 суток	III 14 суток	IV 21 сутки
Дофамин	0,712±0,053	0,523±0,039*	0,518±0,043*	0,563±0,040*
3,4-диоксифенилуксусная кислота	0,189±0,009	0,372±0,031*	0,356±0,028*	0,231±0,025
Гомованилиновая кислота	0,206±0,019	0,539±0,046*	0,447±0,037*	0,463±0,041*
Норадреналин	1,709±0,162	1,041±0,123*	1,103±0,107*	1,479±0,183
5-окситриптофан	0,922±0,086	0,877±0,079	0,893±0,072	0,986±0,107
Серотонин	0,784±0,062	0,698±0,075	0,568±0,046*	0,437±0,048*
5-оксииндолуксусная кислота	0,835±0,079	0,874±0,077	0,621±0,053*	0,754±0,081
ГАМК	1231,7±106,5	1788,3±112,7*	1430,6±230,7	1367,5±152,1

Примечание: здесь и в табл. 2: данные в виде М± m; * – статистически значимые различия с контролем.

ние тормозных процессов у животных 2-й экспериментальной группы.

Увеличение сроков введения морфина до 14 сут (3-я группа) сопровождается более существенными нейромедиаторными нарушениями в изученных отделах мозга в сравнении с предыдущей экспериментальной группой. К концу двухнедельной морфиновой интоксикации в стволе так же, как и у животных 2-й группы, отмечаются признаки усиленного высвобождения катехоламинов из депо. Это подтверждается снижением уровня дофамина и норадреналина на 27 % ($p<0,02$) и 35 % ($p<0,01$) соответственно. Концентрации их метаболитов – 3,4-диоксифенилуксусной и гомованилиновой кислот при этом увеличиваются (табл. 1). В мозжечке животных 3-й группы отмечается увеличение содержания норадреналина, падение концентрации 5-окситриптофана, а также сохранение, как и в предыдущей группе, повышения уровня ГАМК (табл. 2).

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

Показатель	Г р у п п а			
	I Контроль	II 7 суток	III 14 суток	IV 21 сутки
Дофамин	0,162±0,021	0,187±0,019	0,155±0,013	0,149±0,018
3,4-диоксифенилуксусная кислота	0,106±0,014	0,120±0,014	0,097±0,008	0,063±0,005*
Гомованилиновая кислота	0,139±0,016	0,214±0,015*	0,165±0,021	0,151±0,020
Норадреналин	0,732±0,068	0,801±0,063	1,019±0,074*	0,874±0,095
5-окситриптофан	0,097±0,010	0,088±0,011	0,052±0,004*	0,068±0,008
Серотонин	0,104±0,014	0,127±0,013	0,099±0,008	0,071±0,005*
5-оксииндолуксусная кислота	0,115±0,012	0,178±0,014*	0,150±0,020	0,112±0,015
ГАМК	756,7±59,8	1205,8±109,1*	1133,6±122,4*	779,4±93,2

Функциональному состоянию ГАМК-ергической системы ЦНС отводится немаловажная роль в различных проявлениях интоксикации психоактивными веществами [3, 4]. ГАМК обладает выраженной физиологической активностью в отношении фонда мозговых сосудов, а также является регулятором функциональной активности многих структур головного мозга. В частности, в мозжечке ГАМК-ергические интернейроны обнаружены в клетках Пуркинье, звездчатых и корзинчатых клетках, где они координируют церебральные рефлексы и ингибиторные механизмы в спинальных α -мотонейронах [13]. Помимо активного участия ГАМК в осуществлении динамического баланса между процессами торможения и возбуждения в ЦНС, данному нейромедиатору принадлежит важная роль в адаптационных возможностях клеток головного мозга к патологическому воздействию психоактивных веществ. Роль ГАМК заключается при этом в формировании неспецифического метаболического механизма защиты ткани мозга от влияния данных веществ, предполагается, что это происходит путем активации ГАМК-метаболизирующих ферментов [11].

Обращают на себя внимание противоположные сдвиги содержания норадреналина в исследуемых отделах мозга после двухнедельной наркотизации. Это может являться следствием дифференцированного изменения здесь активностей ферментов катаболизма этого нейромедиатора [2]. Кроме этого, немаловажным аспектом является региональная специфика и локализация опиатных рецепторов в различных структурах головного мозга. Данные рецепторы относятся к классу метаботропных, т.е. передача информации осуществляется путем модуляции различных систем вторичных мессенджеров [5].

Известно, что в процессах развития зависимости от морфина участвуют μ и δ -опиатные рецепторы [5]. Предполагается, что формирование признаков опиоидной зависимости взаимосвязано с увеличением числа данных рецепторов, участвующих в процессах положительного подкрепления в ЦНС. Хроническое введение морфина сопровождается увеличением количества μ -опиатных рецепторов в различных отделах головного мозга [3]. Противоположность эффектов морфина на метаболизм отдельных нейромедиаторов в отделах головного мозга может объясняться различной плотностью опиатных рецепторов в этих структурах. Морфин является агонистом μ -опиатных рецепторов, высокое содержание которых обнаружено в стволе, фронтальной коре, медиальной области таламуса и некоторых других отделах головного мозга [17]. Этим, вероятно, объясняется более существенное влияние наркотика на метаболизм изученных медиаторов именно в стволовой части мозга при 14-суточной интоксикации.

Выраженность нейромедиаторных нарушений при трехнедельном назначении морфина в большей степени проявляется в стволе мозга (табл. 1). В этом регионе отмечено статистически значимое снижение уровней дофамина (на 21 %) и серотонина (на 44 %), а также рост концентрации гомованилиновой кислоты (на 124 %). Таким образом, наибольшее влияние хроническая морфинная интоксикация оказывает на функционирование дофаминергической системы стволовой части головного мозга. Дофамин является ключевым нейромедиатором адаптации, выделение которого стимулируется воздействием любых внешних, положительных факторов, включая наркотики. При этом, вероятно, ослабление именно дофаминергического проведения в мезолимбических структурах головного мозга является одним из

важнейших компонентов в системе формирования зависимости от наркотиков [8].

На протяжении многих лет мозжечок традиционно рассматривается как структура мозга, контролирующая статику и координацию движений. В последние годы появляется все больше клинических и экспериментальных подтверждений его наиболее молодой части – неocerebellума – в контроле высших психических функций [12]. Существуют специальные двухсторонние пути, посредством которых мозжечок воздействует на высшую нервную деятельность. Они связывают его с ассоциативными полями больших полушарий [13]. Вследствие этого, нейрохимические отклонения в мозжечке, выявленные нами при хронической морфиновой интоксикации (табл. 2), вероятно, могут иметь отношения к различным нарушениям психики при наркоманиях.

Заключение

Таким образом, хроническая морфиновая интоксикация сопровождается более выраженными нейромедиаторными нарушениями в стволе головного мозга, в сравнении с мозжечком. В стволовой части при этом отмечается изменение функционирования катехоламинергической системы, проявляющееся в усиленной секреции нейромедиаторов из депо с понижением их уровня в ткани мозга и увеличением содержания продуктов катаболизма. В мозжечке регистрируется повышение уровней норадреналина и ГАМК, а также снижение содержания серотонина в отдельные сроки наркотизации.

Литература

1. Анохина, И.П. Общность патогенетических механизмов формирования алкоголизма и наркоманий и пути поиска средств для лечения этих заболеваний / И.П. Анохина, А.Г. Веретинская, Г.Н. Васильева, И.В. Овчинников // Физиология человека. – 2000. – Т. 26. № 6. – С. 74-81.
2. Анохина, И.П. О единстве биологических механизмов индивидуальной предрасположенности к злоупотреблению различными психоактивными веществами / И.П. Анохина, Б.М. Коган, И.В. Маньковская // Фармакология и токсикология. – 1990. – Т. 53, № 4. – С. 4-9.
3. Бычков, Е.Р. Исследование уровня антител к опиатным рецепторам в крови больных опиоидной наркоманией / Е.Р. Бычков, В.В. Востриков, Е.М. Крупицкий и др. // Вопросы мед. химии. – 2001. – Т. 47, № 5. – С. 547-553.
4. Винницкая, А.Г. Функциональная роль ГАМК-шунта в головном мозге белых крыс при алкогольной интоксикации / В.В. Лелевич, Н.П. Канунникова // Вестн. НАН Беларуси. Серия биол. наук. – 1999. – № 4. – С. 121-127.
5. Головкин, А.И. Нейрохимия опиоидной наркомании / А.И. Головкин, А.А. Коноплин, Ю.А. Некрасов // Русский народный сервер против наркотиков: [Электронный ресурс]: Наркология online. Электр. дан. С.-Петербург, 2003. Режим доступа: <http://w3.narcotom.ru/>, свободный.
6. Дорошенко, Е.М. Содержание свободных аминокислот в тромбоцитах и в плазме крови доноров / Е.М. Дорошенко, Л.И. Нефедов, И.И. Климович и др. // Здравоохранение Беларуси. – 1994. – № 12. – С. 20-23.
7. Лелевич, В.В. Нейрохимия / В.В. Лелевич. – Гродно: Из-во ГрГМУ, 2008. – С. 211-216.
8. Лелевич, С.В. Метаболические аспекты морфиновой наркомании / С.В. Лелевич. – Гродно: Из-во ГрГМУ, 2007. – С. 74-83.
9. Мискевич, Д.А. Состояние свободнорадикальных процессов в динамике развития морфиновой интоксикации / Д.А. Мискевич, Н.Э. Петушок, В.В. Лелевич, С.В. Лелевич // Биомед. химия. – 2007. – Т. 53, вып. 2. – С. 190-195.
10. Нефедов, Л.И. Таурин индуцирует дисбаланс пула нейроактивных аминокислот и биогенных аминов в отделах головного мозга / Л.И. Нефедов, Е.М. Дорошенко, В.Ю. Смирнов и др. // Укр. биохим. журнал. – 1996. Т. 68, вып. 1. – С. 21-26.
11. Hassel, B. Carboxylation and anaplerosis in neurons and glia / B. Hassel // Mol. Neurobiol. – 2000. – Vol. 22, N 1-3. – P. 21-40.
12. Leiner, H. Reappraising the cerebellum: what does the hindbrain contribute to the forebrain? // H. Leiner, A. Leiner, R. Dow // Behav. Brain. Res. – 1991. – Vol. 44, N 2. – P. 113-128.
13. Schmahmann, J. Disorders of the cerebellum: ataxia, dysmetria of thought, and the cerebellar cognitive affective syndrome / J. Schmahmann // J. Neuropsychiatry clin. Neurosci. – 2004. – Vol. 16, N 3. – P. 367-378.

Поступила 09.12.08