

# НЕЙРОФАРМАКОЛОГИЯ

## РОЛЬ СИГНАЛЬНОГО КАСКАДА NO/цГМФ В ФОРМИРОВАНИИ ОПИЙНОЙ ЗАВИСИМОСТИ

Д. И. Перегуд<sup>1,2</sup>, А. А. Яковлев<sup>1,2,3</sup>, М. Ю. Степаничев<sup>3</sup>, М. В. Онуфриев<sup>3</sup>,  
Л. Ф. Панченко<sup>1,2</sup>, Н. В. Гуляева<sup>3</sup>

Цель работы — оценка роли каскада окиси азота (NO)/циклический гуанозинмонофосфат (цГМФ) в механизмах формирования зависимости от морфина. Для формирования физической зависимости морфин вводили крысам интраперитонеально дважды в день в течение шести суток в возрастающих дозах — от 10 до 100 мг/кг. При оценке роли каскада NO/цГМФ в формировании зависимости ингибитор NO-синтазы метиловый эфир L-N<sup>G</sup>-нитроаргинина (L-NAME) вводили интраперитонеально в дозе 10 мг/кг за 1 ч перед каждой инъекцией морфина. Введение L-NAME при интоксикации морфином приводило к усилению проявлений спонтанного синдрома отмены, что сопровождалось более выраженным снижением уровня цГМФ в среднем мозге и стриатуме. Предполагается, что регионспецифическое снижение активности сигнального каскада NO/цГМФ в головном мозге может являться одним из механизмов, определяющих формирование опийной зависимости.

**Ключевые слова:** окись азота; циклический гуанозинмонофосфат; метиловый эфир L-N<sup>G</sup>-нитроаргинина; морфин; зависимость; синдром отмены

### ВВЕДЕНИЕ

Хроническое воздействие препаратов группы опиоидов характеризуется быстрым развитием зависимости, механизмы которой недостаточно изучены. Окись азота (NO) является газообразным соединением, выполняющим в нервной системе роль внутри- и межклеточного посредника [7]. NO образуется из аминокислоты L-аргинина в реакции, которую катализирует фермент NO-синтаза (NOS). Основной внутриклеточной мишенью NO является растворимая гуанилатциклаза (ГЦ), которая катализирует образование циклического гуанозинмонофосфата (цГМФ) [7]. С помощью ингибиторного анализа установлено, что NO может быть вовлечен в механизмы реализации острых и хронических эффектов опиоидов [14]. При том, что NO усиливает такие эффекты хронического воздействия опиоидов как развитие толерантности к анальгезии и манифестацию синдрома отмены, информация о вовлеченности NO в развитие зависимости не является однозначной [14]. Анализ литературы показывает, что ранее результаты экспериментов, посвященных иссле-

дованию роли модуляторов сигнального каскада NO/цГМФ в формировании зависимости от морфина, не были сопоставлены с биохимическими показателями данного каскада в тканях головного мозга. Целью настоящей работы явилось параллельное исследование эффектов введения ингибитора синтеза NO на абстинентные проявления у морфин-зависимых крыс и биохимические показатели каскада NO/цГМФ в отделах головного мозга крыс.

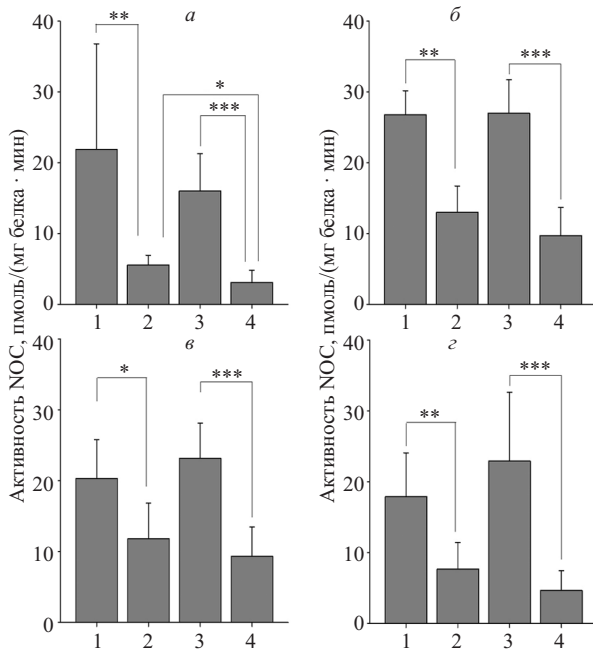
### МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Работа проведена с использованием крыс-самцов Вистар массой 200–300 г. Животных содержали при искусственном цикле освещения и свободном доступе к воде и пище. Были сформированы четыре экспериментальные группы: группа Морфин (формирование зависимости посредством субхронического введения морфина), ( $n = 16$ ); группа Контроль (вместо морфина вводили изотонический раствор NaCl), ( $n = 7$ ); группа Морфин + L-NAME (введение ингибитора NOS — метилового эфира L-нитроаргинина (L-NAME) перед каждой инъекцией морфина) ( $n = 8$ ) и группа Контроль + L-NAME — контрольная группа, получавшая ингибитор NOS ( $n = 8$ ). Для формирования физической зависимости морфин вводили по отработанной схеме [10]. Данная схема представляет собой внутрибрюшинное введение морфина в течение 6 суток дважды в день (в 8.00 и 20.00 ч) в возрастающих дозах от 10 до 100 мг/кг (3 мл/кг). Животные контрольных групп получали инъекции изотонического раствора хлорида натрия равного объема (3 мл/кг). С целью ис-

<sup>1</sup> Лаборатория биохимии (руководитель — акад. РАН Л. Ф. Панченко) ФГБУ Национального научного центра наркологии Минздрава России, 119002, Москва, Мал. Могильцевский пер. 3.

<sup>2</sup> Лаборатория биохимии (руководитель — акад. РАН Л. Ф. Панченко) ФГБУ НИИ общей патологии и патофизиологии РАН, Москва.

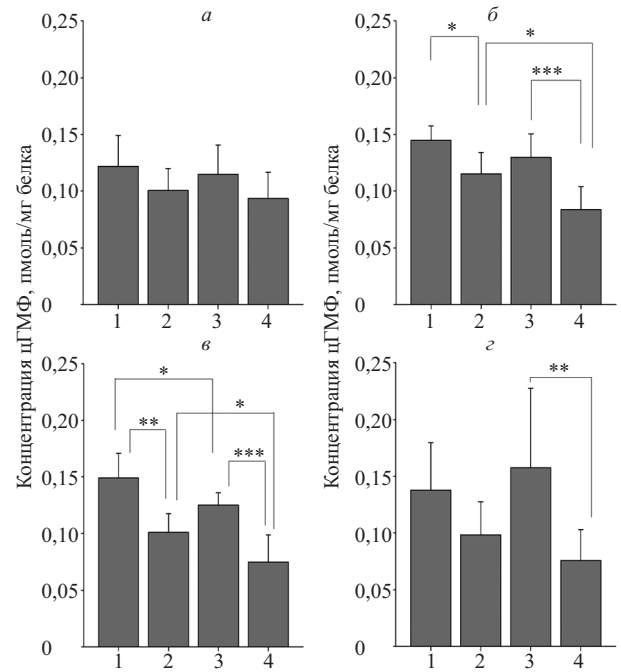
<sup>3</sup> Лаборатория функциональной биохимии нервной системы (руководитель — проф. Н. В. Гуляева) ФГБУ Института высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН, Москва



**Рис. 1.** Активность NOC в отделах головного мозга крыс при отмене морфина в условиях введения L-NAME в период морфинизации. Активность NOC исследовали во фронтальной коре (а), среднем мозге (б), стриатуме (в) и гиппокампе (г) в экспериментальных группах: 1 — Контроль ( $n = 7$ ), 2 — Контроль + L-NAME ( $n = 8$ ), 3 — Морфин ( $n = 16$ ), 4 — Морфин + L-NAME ( $n = 8$ ).

\* — достоверность различий между группами при  $p < 0,05$ , \*\* — при  $p < 0,005$ , \*\*\* — при  $p < 0,0005$ .

следования роли сигнального каскада NO/cGMP в формировании зависимости от морфина ингибитор NOC L-NAME вводили на протяжении морфинизации за 1 ч до каждой инъекции морфина или физиологического раствора в дозе в дозе 10 мг/кг (1 мл/кг). Спонтанный синдром отмены оценивали через 38 ч после введения завершающей инъекции морфина в арене “открытом поле” (диаметр 120 см, высота стенок



**Рис. 2.** Концентрация цГМФ в отделах головного мозга крыс при отмене морфина в условиях введения L-NAME в период морфинизации.

Обозначения те же, что на рис. 1.

40 см). Выраженность синдрома отмены оценивали в течение 5 мин по специфическим двигательным (отряхивания по типу “мокрой собаки”, корчи, жевание, скрип зубами, встряхивание передними лапами) и вегетативным (диарея, птоз, ринорея, пилоэрекция, диспноэ, писк при дотрагивании) признакам [1, 10]. Если было возможно, наблюдаемые признаки регистрировали количественно с дальнейшим присвоением каждому признаку балла, зависящего от специфичности признака. Выраженность синдрома отмены представляли в виде суммы баллов. Через 2 ч после окончания тестирования животных умерщвляли декапитацией.

#### Выраженность спонтанного синдрома отмены морфина при введении L-NAME в период морфинизации

Признак абстиненции	Частота встречаемости признака (число животных, продемонстрировавших признак)			
	Контроль ( $n = 7$ )	Контроль + L-NAME ( $n = 8$ )	Морфин ( $n = 16$ )	Морфин + L-NAME ( $n = 8$ )
Отряхивания по типу “мокрой собаки”	1	0	3	3
Корчи	1	0	10*	6 <sup>#</sup>
Жевание	0	0	2	2
Скрип зубами	0	0	1	2
Встряхивание передними лапами	0	0	6	3
Писк при дотрагивании	0	0	9*	1
Диарея	0	2	1	1
Птоз	0	0	4	4 <sup>#</sup>
Диспноэ	0	0	8*	6 <sup>#</sup>
Пилоэрекция	0	0	0	2

\* — достоверность различий с группой Контроль, <sup>#</sup> — с группой Контроль + L-NAME,  $p < 0,05$  (точный критерий Фишера).

цией, после чего вынимали головной мозг и выделяли отделы головного мозга (средний мозг, гиппокамп, стриатум, фронтальную кору большого мозга), образцы ткани моментально замораживали в жидком азоте. До измерения биохимических показателей, характеризующих звенья сигнального каскада NO/цГМФ образцы тканей мозга хранили в условиях глубокой заморозки. Общую активность NOC в растворимой фракции гомогенатов отделов головного мозга определяли радиометрическим методом по скорости накопления  $^3\text{H}$ -L-цитруллина в реакции окисления  $^3\text{H}$ -L-аргинина, катализируемой NOC [11]. Концентрацию цГМФ измеряли в депротеинизированной растворимой фракции гомогенатов отделов головного мозга методом конкурентного иммуноферментного анализа с использованием набора реактивов производства "Caupan Chemical" (США). Статистический анализ данных проводили при помощи пакета программ STATISTICA 6.0, StatSoft, Inc., США. Результаты представлены в виде  $M \pm SD$  (среднее арифметическое  $\pm$  стандартное отклонение). При анализе влияния L-NAME на частоту встречаемости абстинентных нарушений использовали точный критерий Фишера (таблица 2X2). При расчете достоверности различий между группами (независимыми выборками) использовали непараметрический U-критерий Манна-Уитни.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Введение L-NAME за 1 ч до каждой инъекции морфина на протяжении всего периода формирования зависимости сопровождалось достоверным увеличением суммарной выраженности спонтанного абстинентного синдрома ( $p = 0,04$ , U-критерий Манна-Уитни). Так, в группе морфинизированных животных суммарная выраженность синдрома отмены составила  $7,5 \pm 6,95$  баллов, тогда как в группе получавших L-NAME в период морфинизации данный показатель составил  $14 \pm 8,02$  баллов. При этом анализ частоты встречаемости признаков показал, что введение L-NAME в период морфинизации не оказывало достоверного влияния ни на один из исследованных признаков (таблица).

Как и ожидалось, введение L-NAME в период формирования зависимости сопровождалось статистически значимым снижением активности NOC во всех исследованных отделах мозга в период спонтанной отмены по сравнению с опытной группой, не получавшей ингибитор (рис. 1). Аналогичное снижение активности фермента зарегистрировано и в отделах головного мозга животных контрольной группы, получавшей ингибитор NOC (рис. 1). При этом морфинизация как таковая не вызывала изменений активности NOC в исследованных отделах мозга при спонтанной отмене морфина (рис. 1).

Введение L-NAME в период формирования зависимости от морфина приводило к статистически досто-

верному снижению содержания цГМФ в среднем мозге, стриатуме и гиппокампе по сравнению с опытной группой, не получавшей ингибитор (рис. 2, б – з, соответственно). В контрольной группе, получавшей L-NAME, уровень цГМФ статистически достоверно снижался только в среднем мозге и стриатуме (рис. 2, б и в). При спонтанной отмене морфина концентрация цГМФ статистически достоверно снижалась только в стриатуме (рис. 2, б). При этом концентрация цГМФ в среднем мозге и стриатуме в группе, получавшей ингибитор в период формирования зависимости, была ниже, чем соответствующий показатель в соответствующей контрольной группе (рис. 2, б и в).

С помощью ингибирования синтеза NO или цГМФ посредством введения ингибиторов NOC или ГЦ в период интоксикации морфином или перед провокацией синдрома отмены установлено, что сигнальный каскад NO/цГМФ может участвовать в формировании зависимости или манифестации синдрома отмены, соответственно.

Ранее с помощью ингибиторного анализа было показано, что повышенная активность сигнального каскада NO/цГМФ может составлять механизм, лежащий в основе манифестации абстинентных расстройств при сформированной зависимости от опиоидов [12, 15]. К сожалению, результаты, полученные при исследовании роли NO в формировании зависимости от опиоидов, не являются однозначными. С одной стороны, указывается на то, что повышенная активность сигнального каскада NO является причиной формирования зависимости [2, 3, 6, 13] или, напротив, предотвращает развитие зависимости [5]. С другой стороны, сигнальный каскад NO может и не играть роли в формировании зависимости от опиоидов [9] или ослаблять лишь некоторые признаки зависимости [4, 8]. С целью исследования функциональной значимости изменений активности сигнального каскада NO/цГМФ в отделах головного мозга при формировании зависимости мы вводили L-NAME конкурентно с морфином. Полученные данные свидетельствуют о том, что ингибирование синтеза NO, а, следовательно, и образования цГМФ (зависимо от NO) сопровождается увеличением выраженности абстинентных расстройств, что свидетельствует об увеличении степени зависимости. Эти данные согласуются с результатами работы [5]. Мы установили, что снижение содержания цГМФ в среднем мозге и стриатуме при спонтанной отмене морфина усугубляется при введении L-NAME, что сопровождается усилением абстинентных расстройств, свидетельствует о более выраженной зависимости от морфина. Эти данные косвенно подтверждают, что низкий уровень активности сигнального каскада NO/цГМФ в определенных отделах головного мозга может являться причиной более выраженного формирования опиоидной зависимости. Таким образом, результаты нашей работы позволяют выдвинуть предположение о том, что снижение активности сигнального каскада

NO/цГМФ в стриатуме и/или среднем мозге может являться одним из молекулярных механизмов, определяющих чувствительность к формированию опиоидной зависимости.

## ВЫВОД

Ингибирование синтеза NO при интоксикации морфином приводит к усилению выраженности абстинентных расстройств, характерных для спонтанной отмены, что сопровождается более значительным снижением уровня цГМФ в среднем мозге и стриатуме.

Исследование выполнено при поддержке грантов РФФИ № 07-04-00829-а и № 10-04-01403-а.

## ЛИТЕРАТУРА

1. М. А. Константинопольский, И. В. Чернякова, *Экспер. и клин. фармакол.*, № 10, 12 – 16 (2011).
2. A. O. Abdel-Zaher, M. M. Hamdy, S. A. Aly, et al., *Eur. J. Pharmacol.*, **540**(1–3), 60 – 66 (2006)
3. F. Aricioglu, I. A. Paul, S. Regunathan, *Neurosci. Lett.*, **354**(2), 153 – 157 (2004).
4. H. N. Bhargava, *Gen. Pharmacol.*, **26**(5), 1049 – 1053 (1995).
5. Y. M. Dambisya, T. L. Lee, *Br. J. Pharmacol.*, **117**(5), 914 – 918 (1996).
6. A. R. Dehpour, S. S. Sadr, M. Nouroddini, et al., *Hum. Psychopharmacol.*, **15**(2), 87 – 93 (2000).
7. J. Garthwaite, *Eur. J. Neurosci.*, **27**(11), 2783 – 2802 (2008).
8. N. H. Majeed, B. Przewłocka, H. Machelska, R. Przewłocki, *Neuropharmacology*, **33**(2), 189 – 192 (1994).
9. M. Ozek, Y. Uresin, M. Güngör, *Life Sci.*, **72**(17), 1943 – 1951 (2003).
10. S. Rahman, R. Ali Khan, A. Kumar, *BMC Complement. Altern. Med.*, **2**, 6 (2002).
11. M. Y. Stepanichev, M. V. Onufriev, A. A. Yakovlev, et al., *Neurochem. Int.*, **52**(6), 1114 – 1124 (2008).
12. M. E. Sullivan, S. R. Hall, B. Milne, K. Jhamandas, *Brain Res.*, **859**(1), 45 – 56 (2000).
13. Y. H. Tian, K. W. Lee, I. J. You, et al., *Synapse*, **62**(8), 582 – 589 (2008).
14. N. Toda, S. Kishioka, Y. Hatano, H. Toda, *Anesthesiology*, **110**(1), 166 – 181 (2009).
15. D. B. Vaupel, A. S. Kimes, E. D. London, *Neuropsychopharmacology*, **13**(4), 315 – 322 (1995).

Поступила 01.06.12

## ROLE OF NO/cGMP SIGNALING CASCADE IN THE DEVELOPMENT OF OPIUM DEPENDENCY

D. I. Peregud<sup>1,2</sup>, A. A. Yakovlev<sup>1,2,3</sup>, M. Yu. Stepanichev<sup>3</sup>, M. V. Onufriev<sup>3</sup>, L. F. Panchenko<sup>1,2</sup>, and N. V. Gulyaeva<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Laboratory of Biochemistry, National Research Center of Narcology, Ministry of Public Health of the Russian Federation, Mal. Mogil'tsevskii per. 3, Moscow, 119002, Russia

<sup>2</sup> Laboratory of Biochemistry, Institute of General Pathology and Pathophysiology, Russian Academy of Medical Sciences, ul. Baltiiskaya 8, Moscow, 125315, Russia

<sup>3</sup> Institute of Higher Nervous Activity and Neurophysiology, Russian Academy of Sciences, ul. Butlerova 5a, Moscow, 117845, Russia

This study was aimed at evaluating the role of nitric oxide (NO)/cyclic guanosine monophosphate (cGMP) cascade in mechanisms of morphine dependency formation. Morphine was introduced by intraperitoneal (i.p.) injections in rats twice per day over six days in doses increasing from 10 to 100 mg/kg. For evaluating the role of NO/cGMP cascade, NO synthase inhibitor L-N<sup>G</sup>-Nitroarginine methyl ester (L-NAME) was introduced (10 mg/kg, i.p.) 1 h prior to every injection of morphine. The L-NAME introduction led to enhancement of spontaneous withdrawal syndrome manifestations, which was accompanied by more pronounced decrease in the cGMP levels in midbrain and striatum. It is suggested that the regionspecific decrease in NO/cGMP cascade signaling activity in the brain can be among mechanisms determining the development of opium dependency.

**Keywords:** nitric oxide; cyclic guanosine monophosphate (cGMP); L-N<sup>G</sup>-Nitroarginine methyl ester (L-NAME); morphine; dependency; withdrawal syndrome