

НЕЙРОПРОТЕКТОРНИЙ ЕФЕКТ N-АЦИЛЭТАНОЛАМІНІВ ПРИ ХРОНІЧНІЙ МОРФІННІЙ ЗАЛЕЖНОСТІ. ІІІ. ВПЛИВ НА ВМІСТ НЕЙРОМЕДІАТОРІВ У ГОЛОВНОМУ МОЗКУ ЩУРІВ

Н. М. ГУЛА, М. Ф. ГУЛИЙ, Н. К. ХАРЧЕНКО, Т. М. ГОРІДЬКО, В. М. МАРГІТИЧ

Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України, Київ;
e-mail: ngula@biochem.kiev.ua

Изучали влияние смеси насыщенных и ненасыщенных N-ацилэтанололаминов (NAE) на функциональную активность катехоламин- и серотонинергических систем мозга крыс с морфинной зависимостью. Установлено, что у таких животных наблюдается существенное уменьшение уровня дофамина в гипоталамусе, среднем мозгу и коре головного мозга. Введение NAE вызывает существенное увеличение уровня дофамина в вышеуказанных структурах головного мозга крыс с экспериментальной морфинной зависимостью. При этом содержание серотонина в среднем мозгу и коре головного мозга достоверно уменьшается по сравнению с контролем. Полученные данные свидетельствуют о том, что важным аспектом нейропротекторного действия N-ацилэтанололаминов при морфинной зависимости является восстановление содержания дофамина в структурах мозга.

К л ю ч е в ы е с л о в а: N-ацилэтанололамины, нейромедиаторы, дофамин, морфинная зависимость, мозг.

Активація дофамінової нейротрансмісії відіграє провідну роль у зміні поведінкових реакцій, спричинених наркотичними засобами. Під їхнім впливом, зокрема, зростає рівень екстрацелюлярного дофаміну в мезолімбічній системі, при цьому спостерігається розвиток наркозалежності та стимуляція локомоторної активності. Виявлено, що введення морфіну нокаутним за дофаміновим транспортним білком щурам супроводжується зростанням рівня екстрасинаптичного дофаміну. Ці щури виявляють більшу схильність до морфінної залежності порівняно з такими, які експресують дофаміновий транспортний білок [1]. Відомо, що тварини із хронічною морфінною залежністю характеризуються певним неврологічним симптомокомплексом дофамінової недостатності (катаlepsією, акінезією, ригідністю скелетних м'язів), основою якого є виснаження дофамінергічних систем [2]. Унаслідок гострого введення морфіну відбувається пригнічення дофамінергічної передачі в мозку без блокування постсинаптичних дофамінових рецепторів [3].

На сьогодні запропоновано достатньо обгрунтовану теорію, що пояснює механізм перенесення морфінового сигналу на нейротрофічному сигнальному шляху в нейронах Ventral Tegmental Area (VTA) та його проєкції в *n. accumbens* як поведінковий еквівалент, що характеризує стан морфінної залежності [4]. Більшість авторів вважає, що мезолімбічна дофамінергічна система є важливим нейронним субстратом, в межах якого

розвивається морфінна залежність. Хронічна взаємодія з опіатами призводить до біохімічних змін в цій ділянці мозку. Вони спряжені зі структурними змінами в дофамінергічних нейронах VTA. Так, хронічне вживання морфіну призводить до 25%-го зменшення периметра дофамінергічних нейронів у мезолімбічній дофамінергічній системі. Такому зменшенню можна запобігти завдяки використанню налтрексона (антагоніст опіоїдних рецепторів), а також деяких мозкових нейротрофічних факторів, введених у зону VTA. При цьому розмір недофамінергічних нейронів, а також загальна кількість дофамінергічних нейронів у ній не змінюється [5]. Іншими авторами виявлено зниження кількості дофамінових рецепторів 2-го типу у хвостатому ядрі, блідих кулях та *n. accumbens*. При цьому кількість мРНК нейропептидів зменшується на 30% [6].

Проте з наведеною вище теорією погоджуються не всі автори. Доведено, що фармакологічні засоби, які підсилюють активність катехоламінергічних та холінергічних систем нейронів смугастого тіла, спричинюють зменшення самостійного споживання морфіну у мавп та щурів з морфінною залежністю, що свідчить про патогенетичне значення цих структур у розвитку адикції [7]. Деякі автори вважають, що саме нор-адренергічні нейрони *locus ceruleus* відповідальні за синдром відміни опіатів [8]. На підставі факту відсутності кореляції між дофамінергічною активністю та соматичними проявами абстинентного синдрому декотрі автори дійшли висновку,

що дофамінергічні нейрони мезолімбічної системи не беруть участі в нейробіологічних механізмах, відповідальних за соматичні вияви синдрому відміни [9]. Отже, питання механізму виникнення морфінної залежності все ще залишається відкритим.

Надзвичайно перспективними виявилися дослідження перехресної взаємодії опіоїддергічних та канабіноїддергічних структур головного мозку. Ще в середині 70-х років ХХ сторіччя було помічено, що алкалоїд маріхуани – тетрагідроканабінол – є агоністом центральних канабіноїдних рецепторів, полегшує перебіг абстинентного синдрому в щурів із морфінною залежністю [10]. Знайдено, що морфін та тетрагідроканабінол майже однаковою мірою пригнічують прояви абстинентного синдрому в щурів із морфінною залежністю, причому, на відміну від морфіну, цей ефект тетрагідроканабінолу не усувається введенням антагоніста опіатних рецепторів – налоксону. Це дозволило авторам дійти висновку, що тетрагідроканабінол не опосередковує свою антиабстинентну дію через опіатні рецептори.

Іншими дослідженнями було показано, що психоактивні канабіноїди підвищують активність дофамінергічних нейронів у VTA та мезолімбічній системі. Це дозволило деяким авторам вважати, що ендоканабіноїди є кінцевим нейронним шляхом для низки сполук, які здатні спричинити наркотичну залежність (морфін, етанол та нікотин) через полегшення передавання сигналу в мезолімбічній дофамінергічній системі [12].

Наведені роботи засвідчують відсутність єдиного погляду на патогенез морфінної залежності. Фактично різні автори наводять докази щодо порушень метаболізму тих чи інших нейромедіаторів у певних ділянках мозку. Нашими попередніми роботами також було показано, що при експериментальній опійній наркоманії відбувається істотне зменшення кількості основних фосфоліпідів та ненасичених жирних кислот тканини головного мозку щурів [13]. При цьому N-ацилетаноламіни (NAE) ефективно відновлюють утрату зазначених ліпідів, спричинену морфіном [14, 15]. Нами було висловлено гіпотезу, що морфінна залежність є системним захворюванням, основою якого є істотне порушення різних ланок метаболізму. Якщо таке міркування є слушним, то відновлення головних ланок метаболізму під впливом NAE може забезпечити хоча б часткову нормалізацію вмісту нейромедіаторів, порушеного під впливом хронічного споживання морфіну.

Тому метою роботи було вивчення впливу NAE на вміст моноамінергічних нейромедіаторів у тканині мозку щурів з експериментальною опійною наркоманією.

Матеріали і методи

Досліди з вивчення вмісту моноамінергічних нейромедіаторів та вільних амінокислот у тканині головного мозку проведено на білих щурах-самцях лінії Вістар з масою тіла 200–350 г ($n = 21$). До першої (контрольної) групи увійшло 5 інтактних щурів. До інших двох груп (другої та третьої) увійшли щури, які протягом тижня віддавали перевагу питтю 15%-го розчину етанолу. Після цього тваринам протягом 7 тижнів давали можливість вибирати для пиття 0,01%-й розчин морфіну або питну воду. Під час першого тижня тварини споживали пересічно 0,25 мг морфіну на 1 кг маси тіла. Наприкінці експерименту тварини збільшували дозу випитого морфіну приблизно в 10 разів (2–2,2 мг морфіну на 1 кг маси тіла). Другу групу становили 4 щура-морфініста, яким вводили плацебо. До третьої групи увійшло 8 тварин, яким 7 днів внутрішньочеревинно вводили суміш насичених і ненасичених NAE з різною довжиною ацильного ланцюга (склад суміші наведено в табл. 1) у курсовій дозі 35 мг/кг маси тіла. Тварин декапітували під ефірним наркозом. Мозок виймали і протягом 60 с поміщали у скраплений азот.

Дофамін визначали флуориметричним методом при довжині хвилі збудження 360 нм та довжині хвилі флуоресценції 435 нм [16]. Перед цим його екстрагували із тканини мозку бутанолом з наступним окисленням йодом. Норадреналін визначали флуоресцентним методом шляхом попереднього окислення ацетатного елюату з оксиду алюмінію фериціанідом калію. Флуоресценцію вимірювали при довжині хвилі збудження 436 нм та хвилі флуоресценції – 540 нм

Т а б л и ц я 1. Ацильний склад суміші NAE, яку вводили внутрішньочеревинно щурам з морфінною залежністю (моль%)

Жирна кислота	Моль% від сумарної кількості ацильних залишків
Міристинова	10,92
Пальмітинова	23,27
Пальмітолеїнова	12,25
Стеаринова	5,1
Олеїнова	13,62
Лінолева	1,79
Ліноленова	0,20
Арахідонова	1,19
Ейкозапентаєнова	11,46
Докозагексаєнова	3,05
Інші	17,15

Таблиця 2. Вміст дофаміну (мкг/г тканини) в головному мозку контрольних щурів, щурів із морфінною залежністю та щурів із морфінною залежністю, що отримували NAE ($M \pm m$, $n = 4-8$)

Відділи мозку	Інтактні щури	Щури-морфіністи	Щури-морфіністи + NAE, 35 мг/кг маси тіла
Гіпоталамус	3,10 ± 0,18	1,92 ± 0,14*	4,13 ± 0,86 [#]
Середній мозок	0,480 ± 0,017	0,259 ± 0,017*	0,507 ± 0,044 [#]
Кора головного мозку	0,580 ± 0,080	0,366 ± 0,049*	0,586 ± 0,060 [#]

*Тут і далі в табл. 3, 4: зміни вірогідні порівняно з інтактними щурами, [#] зміни вірогідні порівняно з групою щурів-морфіністів, $p < 0,05$.

[17]. Серотонін (5-окситриптамін) визначали флуориметричним нінгідринним методом при довжині хвилі збудження 490 нм та хвилі флуоресценції – 385 нм після попередньої бутанольної екстракції надосадової рідини гомогенату тканини в 0,4 н. розчині перхлорної кислоти [18]. Вміст вільних амінокислот у тканині цільного головного мозку вивчали за допомогою амінокислотного аналізатора AAA-881.

Одержані результати оброблено статистично з використанням t -критерію Стьюдента.

Результати та обговорення

В табл. 2 наведено результати з вивчення вмісту дофаміну в різних структурах головного мозку щурів з експериментальною опійною наркоманією після введення їм NAE. У тварин з морфінною залежністю рівень дофаміну в гіпоталамусі, середньому мозку та корі головного мозку різко знижується. Введення NAE у курсовій дозі 35 мг/кг призводить до повної нормалізації вмісту цього моноамінергічного нейромедіатора у всіх досліджених відділах головного мозку щурів.

Що стосується вмісту іншого моноамінергічного нейромедіатора – норадреналіну, то як показано в табл. 3, він практично не змінюється у щурів з експериментальною опійною наркоманією. Парентеральне введення NAE у курсовій дозі 35 мг/кг спричинює дворазове збільшення вмісту норадреналіну в гіпоталамусі.

Як впливає з даних, наведених у табл. 4, при експериментальній опійній наркоманії рівень серотоніну в гіпоталамусі, середньому мозку та

корі головного мозку практично не змінюється. Введення NAE щурам з морфінною залежністю спричинює вірогідне, порівняно з інтактними, зменшення кількості серотоніну у зазначених відділах головного мозку.

Загальновідомо, що попередниками катехоламінів є амінокислоти. Теоретично можна припустити дві можливі причини зменшення рівня катехоламінів у різних відділах головного мозку: 1 – дефіцит вільних амінокислот, 2 – порушення процесу перетворення тирозину на катехоламіни. З цією метою нами було проведено визначення вмісту вільних амінокислот у мозку щурів. Необхідно відзначити, що метою цього дослідження не було вивчення особливостей обміну амінокислот, а ставилося завдання виключити або підтвердити наявність дефіциту вільних амінокислот у тканині головного мозку у тварин із морфінною залежністю. Крім того, з огляду на те, що метод визначення вільних амінокислот на амінокислотному аналізаторі має високу вартість, але водночас високу інформативність, в роботу було взято об'єднаний екстракт тканини головного мозку щурів з кожної групи щурів. Як впливає з наведених даних (табл. 5) у щурів з експериментальною хронічною опійною наркоманією спостерігається дворазове зростання загальної кількості вільних амінокислот. При цьому збільшується вміст практично всіх амінокислот, окрім тирозину (попередник дофаміну), кількість якого у тканині мозку зменшується. Це збігається зі зниженням рівня дофаміну в різних відділах головного мозку щурів-морфіністів. Призначення NAE в курсовій дозі 3,5 мг/кг незнач-

Таблиця 3. Вміст норадреналіну (мкг/г тканини) в головному мозку контрольних щурів, щурів із морфінною залежністю, та щурів із морфінною залежністю, що отримували NAE ($M \pm m$, $n = 4-8$)

Відділи мозку	Інтактні щури	Щури-морфіністи	Щури-морфіністи + NAE, 35 мг/кг маси тіла
Гіпоталамус	0,216 ± 0,023	0,538 ± 0,170	0,579 ± 0,080*
Середній мозок	0,050 ± 0,003	0,102 ± 0,030	0,073 ± 0,007
Кора головного мозку	0,032 ± 0,004	0,040 ± 0,080	0,026 ± 0,003

Таблиця 4. Вміст серотоніну (мкг/г тканини) в головному мозку контрольних щурів, щурів із морфінною залежністю та щурів із морфінною залежністю, що отримували NAE ($M \pm m$, $n = 4-8$)

Відділи мозку	Інтактні щури	Щури-морфіністи	Щури-морфіністи + NAE, 35 мг/кг маси тіла
Гіпоталамус	3,780 ± 0,214	4,000 ± 0,638	3,500 ± 0,080
Середній мозок	1,120 ± 0,018	0,824 ± 0,068	0,820 ± 0,023*
Кора головного мозку	0,500 ± 0,080	0,434 ± 0,032	0,393 ± 0,016*

Таблиця 5. Вміст (мкг/г тканини) вільних амінокислот в мозку контрольних щурів, щурів із морфінною залежністю та щурів із морфінною залежністю, що отримували NAE

Амінокислоти	Інтактні щури	Щури-морфіністи	Щури-морфіністи + NAE, 35 мг/кг маси тіла
Лізин	12,2	19,9	13,4
Гістидин	9,3	13,7	6,7
Аргінін		279,9	11,4
Таурин	146,7	264,0	145,9
Аспартат	149,9	267,2	117,1
Треонін	23,1	52,9	22,6
Серин	40,8	61,7	26,3
Глутамат	555,7	1024,5	524,2
Пролін	16,8	18,3	12,0
Гліцин	49,3	78,3	49,3
Аланін	24,9	43,1	20,7
Цистеїн	8,7	15,9	1,4
Валін	18,2	12,4	4,3
Метіонін	7,8	21,3	1,4
Ізолейцин	37,3	45,5	4,0
Лейцин	3,5	4,8	10,6
Тирозин	7,2	5,9	8,3
Фенілаланін	7,2	10,8	1,1
γ-Аміномасляна кислота	134,6	242,2	107,8
Глутамін	243,0	406,0	219,0
Разом (без глутаміну)	1255,3	2482,4	1088,6

но впливає на вміст вільних амінокислот у тканині головного мозку. Однак введення цієї сполуки в курсовій дозі 35 мг/кг практично відновлює рівень вільних амінокислот у тканині головного мозку щурів з експериментальною опійною наркоманією. При цьому значно підвищується абсолютний вміст тирозину, що поєднується з відновленням вмісту дофаміну в гіпоталамусі, середньому мозку та корі головного мозку щурів з морфінною залежністю.

В цій роботі вперше доведено репараційний вплив NAE на вміст дофаміну та вільних амінокислот у тканинах головного мозку щурів з експериментальною опійною наркоманією. Одержані дані свідчать, що сполуки класу NAE здатні ефективно протидіяти несприятливому впливу морфіну на вміст моноамінергічних нейромедіаторів та вільних амінокислот у тканині головного мозку вже за курсової дози 35 мг/кг.

**NEUROPROTECTIVE EFFECT
OF N-ACYLETHANOLAMINES UNDER
CHRONIC MORPHINE DEPENDENCE.
III. INFLUENCE ON THE
NEUROTRANSMITTERS CONTENT
IN THE RAT BRAIN**

*N. M. Gula, M. F. Guly, N. K. Kharchenko,
T. M. Goridko, V. M. Margitich*

Palladin Institute of Biochemistry, National Academy
of Sciences of Ukraine, Kiev;
e-mail: ngula@biochem.kiev.ua

S u m m a r y

The effect of the mixture of saturated and unsaturated N-acylethanolamines (NAEs) on the functional activity of catecholamine- and serotonergic systems of the rat brain with experimental morphine dependence was investigated. A significant decrease of dopamine levels was found in the hypothalamus, midbrain and cortex of rats with morphine dependence. The administration of NAEs to rats with morphine dependence in time course dose of 35 mg/kg markedly increased the levels of dopamine in the hypothalamus, middle brain and cortex. Simultaneously the significant decrease of serotonin content was observed in the midbrain and cortex. The results obtained suggest that one of the important aspects of neuroprotective action of NAEs under morphine dependence is the restoration of dopamine content in the brain.

Key words: N-acylethanolamines, neurotransmitters, dopamine, morphine dependence, brain.

1. *Spielewoy C., Gonon F., Roubert C. et al. // Eur. J. Neurosci. 2000. 12, N 5. P. 1827–1837.*
2. *Kuschinsky K., Celsen B., Huppertz A. // Int. J. Clin. Pharmacol. Biopharm. 1975. 12, N 1–2. P. 129–133.*
3. *Kuschinsky K. // Arzneimittelforschung. 1976. 26, N 4. P. 563–567.*

4. *Nestler E. J., Berhow M. T., Brodtkin E. S. // Mol. Psychiatry. 1996. 1. P. 190–199.*
5. *Skclair-Tavron L., Shi W. X., Lane S. B. et al. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1996. 93, N 20. P. 11202–11207.*
6. *Georges F., Stinus L., Bloch B., Le Moine C. // Eur. J. Neurosci. 1999. 11, N 2. P. 481–490.*
7. *Smith J. E., Co C., Freeman M. E., Sands M. P., Lane J. D. // Nature. 1980. 287, N 5778. P. 152–154.*
8. *Caille S., Espejo E. F., Reheric J. P. et al. // J. Pharmacol. Exp. Ther. 1999. 290, N 2. P. 881–892.*
9. *Diana M., Muntoni A. L., Pistis M. et al. // Eur. J. Neurosci. 1999. 11, N 3. P. 1037–1041.*
10. *Hine B., Friedman E., Torrelino M., Gershon S. // Neuropharmacology. 1975. 14, N 8. P. 607–610.*
11. *Zaluzny S. G., Chesher G. B., Jackson D. M., Malor R. // Psychopharmacology (Berl). 1979. 61, N 2. P. 207–216.*
12. *Ameri A. // Prog. Neurobiol. 1999. 58, N 4. P. 315–348.*
13. *Гула Н. М., Маргітич В. М., Говсєєва Н. М. та ін. // Укр. біохім. журн. 1998. 70, № 2. С. 98–105.*
14. *Гула Н. М., Маргітич В. М., Артамонов В. М. та ін. // Укр. біохім. журн. 2004. 76, № 5. С. 123–131.*
15. *Гула Н. М., Маргітич В. М., Горідько Т. М. та ін. // Там само. 2005. 77, № 2.*
16. *Коган В. М., Нечаєв Н. В. // Лаб. дело. 1975. № 5. С. 301–303.*
17. *Матлина Э. Ш. Методы клинической биохимии гормонов и медиаторов. М.: Медицина. 1966. С. 57–61.*
18. *Snyder S. H., Axelrod J., Zweig M. // Biochem. Pharmacol. 1965. 14, N 11. P. 831–841.*

Отримано 21.06.2004