

СОСТОЯНИЕ ПУЛА СВОБОДНЫХ АМИНОКИСЛОТ ПЛАЗМЫ КРОВИ ПРИ ПРЕРЫВИСТОЙ МОРФИНОВОЙ ИНТОКСИКАЦИИ РАЗНОЙ ДЛИТЕЛЬНОСТИ

Лелевич В. В., Виницкая А. Г., Лелевич С. В., Смирнов В. Ю., Сарана Ю. В.

Учреждение образования «Гродненский государственный медицинский университет», г. Гродно, Республика Беларусь

Реферат. Разработана модель прерывистой морфиновой интоксикации, основанная на 1, 2, 3 и 4-х циклах внутрибрюшинного введения крысам морфина (дважды в сут, 4 сут, 30 мг/кг в течение 1-го цикла, 40 мг/кг в течение последующих циклов), перемежающихся периодами, свободными от наркотика. Исследовано влияние прерывистого введения морфина на уровни свободных аминокислот и их производных в плазме крови. Наиболее значительные изменения исследуемых показателей проявились после 3-х и 4-х циклов прерывистой морфиновой интоксикации. Среди них: уменьшение концентраций ароматических, незаменимых и кетогенных аминокислот после 3-х циклов введения морфина. Введение морфина максимальной длительности сопровождается статистически значимым ростом в плазме концентраций АРУЦ, незаменимых аминокислот и суммарного количества всех аминокислот, что указывает на активный протеолиз в тканях.

Ключевые слова: прерывистая морфиновая интоксикация, пул свободных аминокислот, ВЭЖХ, плазма крови.

Введение. Морфин является первичным метаболитом героина, который активно используется в экспериментальной наркологии для моделирования опийной интоксикации и зависимости [1]. Попадая в организм, морфин оказывает действие на большинство органов и тканей, т. к. в одних клетках он взаимодействует со специальными рецепторами, в других — превращается в более активные метаболиты, а третьи подвергаются действию гормонального дисбаланса [1, 2]. В литературе описаны два экспериментальных режима морфиновой интоксикации, относящиеся к хроническому (continuous) и прерывистому (intermittent) введению наркотика [2]. Последний моделирует наиболее распространенный характер употребления наркотиков в человеческой популяции, который можно рассматривать как чередование более или менее длительных периодов опийной интоксикации и отмены их потребления. В этой связи прерывистую морфиновую интоксикацию следует расценивать как новое клиническое состояние наркомании с учетом выраженных клинических и патохимических симптомов морфиновой абстиненции [3].

Пул свободных аминокислот плазмы крови представлен набором метаболически и функционально взаимосвязанных соединений, концентрации которых отражают процессы, происходящие в организме в самых различных экспериментальных и патологических ситуациях [4]. Учитывая необходимость привлечения фундаментальных знаний при разработке медикаментозных методов лечения опиоидной зависимости, представляется целесообразным комплексное изучение эффектов прерывистой морфиновой интоксикации на содержание в плазме крови различных аминокислот и родственных им соединений.

Цель работы — оценка влияния прерывистого введения морфина разной длительности на состояние пула свободных аминокислот и их производных в плазме крови крыс.

Материалы и методы. Была разработана и проведена экспериментальная модель прерывистой морфиновой интоксикации путем циклического, субхронического введения крысам раствора морфина в увеличивающихся дозах с целью формирования толерантности. Эксперименты были выполнены на 40 белых беспородных крысах-самцах массой 180–220 г. Животных содержали при естественном цикле освещения и свободном доступе к воде и пище.

Контрольная группа крыс (1-я) была сформирована из животных, которым внутривентриально 2 раза в сут вводили эквивалентные количества физиологического раствора, используя прерывистые схемы его введения, как в группах прерывистой морфиновой интоксикации. Выбор единого контроля для всех подопытных групп животных был обусловлен отсутствием достоверных и статистически значимых различий в уровнях изученных соединений в тканях крыс, подвергнутых нескольким циклам введения физиологического раствора [3]. Во 2-й подопытной группе морфин вводили в суточной дозе 30 мг/кг массы тела два раза в сут в течение первых 4-х сут. В последующие три дня никаких манипуляций не производили. В 3-й подопытной группе использовали два цикла введения морфина. В 4-й группе количество циклов прерывистого введения наркотика составило три, в 5-й группе — четыре. Забой животных контрольной и подопытных групп проводился соответственно на 7; 15; 22 и 29-е сут от начала эксперимента в зависимости от количества циклов введения морфина или физиологического раствора.

В хлорном экстракте плазмы крови измеряли уровни свободных аминокислот и их производных методом обращенно-фазной хроматографии [5]. Дополнительно были измерены суммарные количества аминокислот: ароматических, с разветвленной углеродной цепью (далее — АРУЦ), заменимых и незаменимых, глико- и кетогенных, а также сумма всех аминокислот. Были изучены соотношения пулов аминокислот: АРУЦ/ароматические аминокислоты, заменимые/незаменимые, гликогенные/кетогенные аминокислоты. Достоверность различий между группами оценивали с применением дисперсионного анализа (ANOVA). Концентрации изученных показателей выражали в мкмоль/л. Результаты были представлены как средняя ошибка — стандартное отклонение.

Результаты и их обсуждение. Результаты исследований указывают на то, что введение морфина в прерывистом режиме вызывает значительные изменения обменных процессов в тканях организма, что выражается в дисбалансе пула свободных аминокислот в плазме крови. Выраженность этих изменений напрямую зависит от продолжительности поступления наркотика в организм и количества циклов «морфин — отмена наркотика».

Так, 2-я подопытная группа характеризуется наименьшей продолжительностью токсического воздействия морфина. Введение морфина в течение 4-х сут привело к достоверному повышению в плазме содержания восстановленного глутатиона, этаноламина, гистидина и фенилаланина и снижения концентраций глутамина, аланина и орнитина, относительно контроля (таблица 1). Рост уровня восстановленного глутатиона в плазме может быть связан с адаптивной активацией антиоксидантных процессов в тканях при этом виде морфиновой интоксикации. Подобный эффект повышения в крови уровней антиоксидантов наблюдали другие исследователи при моделировании хронической морфиновой интоксикации и синдрома отмены наркотика [6]. Одновременно в этой группе крыс достоверно выросло суммарное содержание кетогенных аминокислот и снизилось соотношение «заменимые/незаменимые аминокислоты» (таблица 2). Уровни остальных показателей аминокислотного пула плазмы крови достоверно не изменились.

Таблица 1. — Содержание аминокислот и их производных (мкмоль/л) в плазме крови крыс при прерывистой морфиновой интоксикации (далее — ПМИ)

| Показатели | Экспериментальные группы | | | | |
|------------------------------|--------------------------|---------------------|----------------------|----------------------|----------------------|
| | контроль | № 2 ПМИ — 1 цикл | № 3 ПМИ — 2 цикла | № 4 ПМИ — 3 цикла | № 5 ПМИ — 4 цикла |
| Аспаргат | 33,6±,9 | 35,9±4,0 | 27,9±1,0• | 29,7±1,3 | 32,4±1,1 |
| Глутатион восстановленный | 2,71±0,39 | 3,80±0,50* | 2,11±0,13• | 2,32±0,08• | 2,58±0,07• |
| Глутамат | 232±27 | 239±33 | 228±12 | 225±14 | 286±15# |
| Аспарагин | 59,4±6,3 | 68,9±10,9 | 53,8±1,7 | 61,5±2,4 | 71,7±1,9• |
| Серин | 296±45 | 302±43 | 364±14 | 288±19 | 335±24 |
| Глутамин | 715±53 | 539±64* | 690±28 | 667±25 | 806±112• |
| Гистидин | 74,0±5,3 | 86,8±4,0* | 85,4±2,6 | 74,3±4,2•• | 74,3±4,8 |
| Глицин | 134±24 | 105±14 | 161±10• | 133±6 | 199±16*•# |
| Аргинин | 209±24 | 245±20 | 181±11• | 160±8*• | 197±12 |
| Аланин | 654±62 | 572±121* | 670±46• | 690±21• | 512±17# |
| Таурин | 189±15 | 248±15 | 167±3 | 172±8• | 227±24• |
| ГАМК | 4,55±0,76 | 4,91±0,91 | 3,80±0,27 | 3,33±0,16 | 3,12±0,24 |
| Тирозин | 105±7 | 96±8 | 86±3* | 85±5* | 106±4•# |
| Этаноламин | 12,7±1,0 | 16,7±1,6* | 13,3±0,7• | 14,2±1,1 | 17,9±1,3*•# |
| Валин | 218±22 | 212±21 | 199±6 | 209±8 | 245±9• |
| Метионин | 64,1±5,8 | 72,7±4,7 | 59,2±2,1• | 57,9±1,8• | 65,9± 2,6 |
| Триптофан | 125±10 | 116±9 | 97±3* | 103±10 | 99±6* |
| Фенилаланин | 89,6±7,2 | 106,0±5,4* | 84,8±2,3• | 85,5±2,9• | 98,6±3,5•# |
| Изолейцин | 101±13 | 107±13 | 92±5 | 99±5 | 144±11*••# |
| Лейцин | 168±15 | 174±14 | 158±4 | 159±6 | 182±4 |
| Орнитин | 36,6±3,4 | 25,0±5,6* | 37,8±1,3• | 38,7±2,2• | 30,9±3,7 |
| Лизин | 226±28 | 296±46 | 165±21• | 149±11*• | 34 ±22*•# |

* — статистически значимые различия с контролем;
• — статистически значимые различия с группой № 2;
♦ — статистически значимые различия с группой № 3;
— статистически значимые различия с группой № 4.

Таблица 2. — Показатели аминокислотного пула в плазме крови крыс (мкмоль/л) при ПМИ

| Показатели | Экспериментальные группы | | | | |
|---|--------------------------|---------------------|----------------------|----------------------|----------------------|
| | контроль | № 2 ПМИ — 1 цикл | № 3 ПМИ — 2 цикла | № 4 ПМИ — 3 цикла | № 5 ПМИ — 4 цикла |
| Ароматические аминокислоты | 320±22 | 318±21 | 268±5*• | 274±12*• | 304±11 |
| АРУЦ | 486±49 | 493±45 | 449±14 | 467±18 | 571±21♦# |
| АРУЦ/аромати- ческие аминокислоты | 1,51±0,06 | 1,54±0,08 | 1,68±0,04 | 1,71±0,05*• | 1,89±0,09*•♦ |
| Заменимые аминокислоты | 2229±206 | 1959±272 | 2281±91 | 2179±54 | 2349±154 |
| Незаменимые аминокислоты | 1341±88 | 1475±94 | 1245±32• | 1215±53• | 1647±67*•♦# |
| Заменимые/ незаменимые аминокислоты | 1,67±0,13 | 1,32±0,14* | 1,84±0,07• | 1,82±0,09• | 1,44±0,12♦• |

Окончание таблицы 2

| Показатели | Экспериментальные группы | | | | |
|--|--------------------------|---------------------|----------------------|----------------------|----------------------|
| | контроль | № 2 ПМИ — 1 цикл | № 3 ПМИ — 2 цикла | № 4 ПМИ — 3 цикла | № 5 ПМИ — 4 цикла |
| Гликогенные аминокислоты | 2965±253 | 2782±327 | 3024±109 | 2872±78 | 3216±153 |
| Кетогенные аминокислоты | 394±25 | 471±36* | 323±20*• | 308±10*• | 530±25*•# |
| Гликогенные/ кетогенные аминокислоты | 7,69±0,87 | 6,14±0,92 | 9,71±0,91• | 9,40±0,40• | 6,11±0,39*# |
| Сумма аминокислот | 4139±287 | 4090±362 | 4041±107 | 3898±103 | 4609±184# |
| * — статистически значимые различия с контролем; • — статистически значимые различия с группой № 2; ♦ — статистически значимые различия с группой № 3; # — статистически значимые различия с группой № 4. | | | | | |

Увеличение продолжительности введения морфина на фоне периода лишения наркотика (3-я группа) оказало более выраженное воздействие на изученные показатели аминокислотного пула в плазме крови. На 15-е сут после двух циклов морфиновой интоксикации значительно снизились уровни тирозина и триптофана по отношению к контролю, что вызвало статистически значимое снижение общего пула ароматических аминокислот (таблицы 1, 2). Сравнение концентраций свободных аминокислот в группах с большей (3-я группа) и меньшей морфиновой нагрузкой (2-я группа) показало достоверное уменьшение уровней незаменимых аминокислот (аргинина, метионина, фенилаланина и лизина) на фоне снижения суммарного пула незаменимых аминокислот. Одновременно уменьшились концентрации этаноламина, аспартата, глутатиона, на фоне повышения глицина, аланина и орнитина (таблица 1). Снижение пула незаменимых аминокислот на фоне неизменного пула заменимых вызвало достоверное падение соотношения «заменимые/незаменимые аминокислоты» относительно 2-й группы. Одновременно в плазме крови снизился общий пул кетогенных аминокислот, что привело к росту соотношения «гликогенные/кетогенные» аминокислоты по сравнению с 2-й группой (таблица 2).

Увеличение длительности морфиновой интоксикации до трех циклов (4-я группа) сопровождалось еще более выраженными сдвигами аминокислотного пула плазмы крови, что свидетельствует о возможном усилении метаболических нарушений в тканях. Так, в плазме крови крыс этой группы регистрируется достоверное снижение концентраций гистидина, аргинина, таурина, тирозина, метионина и лизина и увеличение аланина и орнитина по отношению к значениям во 2-й группе (таблица 1). Снижение пула ароматических аминокислот по отношению к контролю и 2-й группы сопровождалось ростом индекса Фишера соотношения «аминокислоты с разветвленной углеродной цепью АРУЦ/ароматические аминокислоты», которому отводится важная роль в диагностике функциональных нарушений печени [6]. Снижение уровня глутатиона в плазме крови крыс, подвергнутым 3-м циклам прерывистой морфиновой интоксикации, вероятно, свидетельствовало об ослаблении антиоксидантной активности плазмы крови, вызванной длительным поступлением морфина в организм. В настоящее время доказана способность морфина активировать процессы оксидативного стресса в тканях, особенно при длительном введении [7]. Помимо этого, здесь наблюдали статистически значимое снижение концентраций незаменимых и кетогенных аминокислот, что привело к повышению соотношений «заменимые/незаменимые», «гликогенные/кетогенные» аминокислоты. Эти изменения повторяли сдвиги, наблюдаемые в группе крыс, подвергнутых двум циклам прерывистой морфиновой интоксикации (таблица 2). Тем не менее они отличались большей выраженностью в связи с увеличением продолжительности токсического воздействия.

Применение четырех циклов морфиновой интоксикации в 5-й группе вызвало еще более выраженные сдвиги в концентрациях отдельных групп аминокислот. Здесь наблюдали значительное повышение в плазме концентраций аминокислот с разветвленной углеродной цепью (изолейцина и валина) по отношению к 4-й группе (таблица 1). Это привело к увеличению общего пула АРУЦ и соотношения «АРУЦ/ароматические аминокислоты» (таблицы 1, 2). Кроме этого, в этой ткани выросли концентрации незаменимых и кетогенных аминокислот, что привело к статистически значимому росту суммарной концентрации изученных соединений по сравнению с 4-й группой (таблица 2). Аккумуляция в плазме крови свободных аминокислот, и особенно, незаменимых, может свидетельствовать об активном распаде белков

в тканях, вызванных наиболее длительным режимом морфиновой интоксикации. Следовательно, применение 4-х циклов прерывистой морфиновой интоксикации вызывает наиболее выраженный дисбаланс изученных показателей аминокислотного пула плазмы крови.

Заклучение. Таким образом, прерывистый режим введения морфина сопровождается статистически значимыми сдвигами в концентрациях изученных показателей аминокислотного пула. Этот дисбаланс проявляется уже после 4-дневного введения морфина и усиливается после применения нескольких циклов введения препарата. Наиболее значительные изменения в уровнях показателей аминокислотного пула происходят после 3 и 4-х циклов прерывистой морфиновой интоксикации. Среди них уменьшение концентраций ароматических, незаменимых и кетогенных аминокислот после трех циклов введения морфина. Прерывистая морфиновая интоксикация максимальной длительности сопровождается статистически значимым ростом в плазме концентраций АРУЦ, незаменимых аминокислот и суммарного количества всех аминокислот, что указывает на активный протеолиз в тканях. Анализ динамики уровня восстановленного глутатиона в плазме крови опытных крыс свидетельствует об активации антиоксидантных процессов в группе с минимальной токсической нагрузкой и угнетении их в группах животных, подвергнутых нескольким циклам прерывистой морфиновой интоксикации.

Литература

1. Le Moal, M. Drug addiction : pathways to the disease and pathophysiological perspectives / M. Le Moal, G. F. Koob // *Eur. Neuropsychopharmacol.* — 2007. — Vol. 17, № 6–7. — P. 377–393.
2. Chronic and intermittent morphine treatment differently regulates opioid and dopamine systems : a role in locomotor sensitization // T. Le Marec [et al.] // *Psychopharmacology (Berl).* — 2011. — Vol. 216, № 2. — P. 297–303.
3. Влияние прерывистой морфиновой интоксикации на состояние пула нейроактивных аминокислот и биогенных аминов в отделах головного мозга / В. В. Лелевич [и др.] // *Нейрохимия.* — 2015. — Т. 32, № 3. — С. 252–258.
4. Шейбак, В. М. Аминокислоты и иммунная система / В. М. Шейбак, М. В. Горещкая. — М. : Изд-во «Пальмир», 2010. — 356 с.
5. Дорошенко, Е. М. Методика определения свободных аминокислот и их производных в тканях и биологических жидкостях человека методом высокоэффективной жидкостной хроматографии / Е. М. Дорошенко, Л. И. Нефедов, А. А. Глазев; МВИ. МН 806-98 : утв. БелГИМ. — Минск, 2008.
6. Measurement of serum branched-chain amino acids to tyrosine ratio level is useful in a prediction of a change of serum albumin level in chronic liver disease / K. Suzuki [et al.] // *Hepatol. Res.* — 2008. — Vol. 38, № 3. — P. 267–272.
7. Влияние синдрома отмены морфина на показатели свободнорадикального гомеостаза и систему оксида азота в печени и тимусе крыс / Л. Ф. Панченко [и др.] // *Биомед. химия.* — 2004. — Т. 50, № 5. — С. 460–470.

FREE AMINO ACIDS IN THE BLOOD PLASMA AFTER DISCONTINUOUS MORPHINE INTOXICATION OF DIFFERENT DURATION

*Lelevich V. V., Vinitzkaya A. G., Lelevich S. V., Smirnov V. Y., Sarana Y. V.
Educational Establishment "Grodno State Medical University", Grodno, Republic of Belarus*

The rodent model of the discontinuous morphine intoxication was developed, based on the 1, 2, 3, and 4 cycles of intraperitoneal morphine administration to rats (twice daily for 4 days, 30 mg/kg during the 1st cycle, 40 mg/kg during the next cycles). These cycles were alternated with the drug free periods. The influence of discontinuous morphine treatment was studied on the levels of amino acids and their derivatives in the blood plasma. The most significant changes in the indices tested were noted after 3 and 4 cycles of morphine administration. The 3 cycles of the intermittent morphine administration led to decrease in the plasma levels of aromatic, essential and ketogenic amino acids. The most prolonged morphine intoxication was followed by significant accumulation in the blood of all amino acids, especially the branched chain and essential ones that might suggest activation of proteolysis in the tissues.

Keywords: discontinuous morphine intoxication, free amino acids, HPLC, blood plasma.