

На правах рукописи



003063065

ШОХОНОВА ВЕРА АЛЕКСЕЕВНА

**ВЛИЯНИЕ АНАЛОГА ТЕТРАПЕПТИДА ХОЛЕЦИСТОКИНИНА НА
ПОВЕДЕНЧЕСКИЕ И НЕЙРОХИМИЧЕСКИЕ ЭФФЕКТЫ МОРФИНА
У КРЫС**

14 00 45- наркологию

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

2 3 МАЙ 2007

Москва – 2007

Работа выполнена в лаборатории радиорецепторных исследований
ФГУ «Национальный научный центр наркологии Федерального агентства по
здравоохранению и социальному развитию» (директор – д м н , член
корреспондент РАМН, профессор Н Н Иванец)

Научный руководитель:

Доктор биологических наук

Проскурякова Татьяна Васильевна

Официальные оппоненты:

Доктор медицинских наук,
член-корреспондент РАМН,
профессор

Судаков Сергей Константинович

Доктор биологических наук

Башкатова Валентина Германовна

Ведущая организация – ФГУ «Государственный научный центр
социальной и судебной психиатрии им В П Сербского Росздрава»

Защита диссертации состоится ²⁹ « » мая 2007 г в ¹⁰ часов на заседании
диссертационного совета Д 208 051 01 при ФГУ ННЦ наркологии Росздрава
по адресу 119002, Москва, Малый Могильцевский пер , д 3

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГУ ННЦ наркологии
Росздрава (119002, Москва, Малый Могильцевский пер , д 3)

Автореферат разослан ^{26 апреля} « » 2007 г

Ученый секретарь диссертационного совета,

кандидат биологических наук

Галева Наталья Николаевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования. В России наиболее часто употребляемыми наркотическими средствами являются опий кустарного производства, героин и его самодельные аналоги (Иванец НН и др, 2005, Кошкина ЕА и др, 2005, Кошкина ЕА и др, 2006), поэтому лечение и профилактика опийной наркомании является чрезвычайно актуальной проблемой

Согласно современным представлениям, в формировании зависимости от опиатов существенную роль играет изменение опиоидной рецепции, прежде всего, на уровне таких регуляторных процессов, как десенситизация и интернализация рецепторов (Williams J T et al, 2001) В связи с этим в научной литературе обсуждается возможность поиска эффективных средств лечения опийной наркомании среди соединений, модулирующих опиоидную рецепцию (Blake A D et al, 1997), а в клинической наркологии в настоящее время широко используются препараты, являющиеся антагонистами опиоидных рецепторов (Сиволап Ю П Савченков В А, 2005)

Физиологические эффекты опиоидных пептидов реализуются посредством их взаимодействия со специфическими рецепторами μ -, δ - и κ -типа, широко представленными в ЦНС и на периферии (Mansour A et al, 1995), и регулируются большим числом нейромодуляторов, в том числе и биологически активными фрагментами холецистокинина (cholecystokinin, ССК) - окта- и тетрапептидами ССК, ССК-8 и ССК-4 (Wiesenfeld-Hallin Z et al, 1999) Если ССК-8 взаимодействует в ЦНС с двумя типами ССК-рецепторов (ССК1 и ССК2), то ССК-4 обладает выраженной селективностью к ССК2-рецепторам (Rehfeld J F et al, 1985, Wank S A, 1995) Авторадиографические исследования показали, что биологически активные фрагменты ССК и опиоидные пептиды обнаруживаются в одних и тех же морфологических структурах мозга, а их специфические рецепторы локализованы на мембране одних и тех же нейронов (Noble F, et al, 1993, Zhang X et al, 2000)

В большинстве работ, посвященных изучению взаимодействия между ССК- и опиоидной системами, исследуется влияние лигандов ССК-рецепторов на анальгетический эффект эндогенных опиоидов и морфина (Itoh S et al , 1982, Ding X L et al , 1986, Friedrich A E , Gebhart G F , 2000, Falcio J F et al , 2001) И лишь незначительное число исследований пытается ответить на вопрос, каким образом лиганды ССК-рецепторов модифицируют подкрепляющий и анксиолитический эффекты опиоидов, а также поведенческие и вегетативные реакции, индуцируемые отменой морфина у животных опиоидной зависимостью (Valverde O et al , 1996, Hernando F et al , 1996, Kayser V et al , 1998)

В настоящее время доминирует мнение, что стимуляция ССК2-рецепторов снижает анальгетическое действие морфина и эндогенных опиоидных пептидов (Backus R C et al , 1997), тогда как антагонисты ССК2-рецепторов усиливают индуцируемые опиоидами анальгезию (Smadja C et al , 1995) и антидепрессантно-подобный эффект (Backus R C et al , 1997) В то же время, сообщается и о способности агонистов ССК-рецепторов (ССК-8S и церулеина) предотвращать развитие толерантности к анальгетическому эффекту морфина при его длительном употреблении и снижать выраженность синдрома отмены наркотика (Zarrindast M R et al , 1995, Zarrindast M R et al , 1997) При этом практически открытым остается вопрос о влиянии лигандов ССК-рецепторов на связывающую и функциональную активность опиоидных рецепторов

Представленные данные послужили основанием для проведения настоящего исследования, в котором в качестве лиганда ССК-рецепторов планировалось использовать пептидное соединение, созданное путем модификации эндогенного тетрапептида ССК (аналог ССК-4) с выраженной избирательностью к ССК1-рецепторам (Анохина И П и соавт , 1999, Проскурякова Т В , 2000)

Цель работы состояла в изучении влияния аналога ССК-4 на опиоидергические механизмы формирования толерантности и зависимости от морфина у животных

Задачи исследования:

1 Исследовать влияние аналога ССК-4 на выраженность эффектов однократного и хронического введения морфина анальгетического действия морфина, толерантности и зависимости от наркотика

2 Изучить характер влияния аналога ССК-4 на связывающую активность агонистов опиоидных рецепторов в экспериментах *in vitro*

3 Изучить влияние аналога ССК-4 на связывающую и функциональную активность опиоидных и холецистокининовых рецепторов в различных структурах мозга крыс при однократном и хроническом введении морфина

4 Оценить влияние аналога ССК-4 на потребление морфина в условиях свободного выбора у животных с опиоидной зависимостью

Научная новизна. Структура аналога ССК-4, созданного путем модификации эндогенного тетрапептида холецистокинина является приоритетной. Впервые установлено, что аналог ССК-4 подавляет развитие основных симптомов опиоидной зависимости, а именно, предотвращает развитие толерантности к анальгетическому эффекту морфина, снижает тяжесть физической зависимости от наркотика, а также снижает потребление морфина у животных с опиоидной зависимостью. Механизм действия аналога ССК-4 при однократном и хроническом введении морфина связан с его модулирующим влиянием на связывающую и функциональную активность опиоидных рецепторов в структурах мозга

Практическое значение. Проведенные исследования выявили у аналога ССК-4 фармакологическую активность, которая позволяет рассматривать это соединение в качестве потенциального средства для лечения опиоидной наркомании. Это пополнит имеющийся на настоящий момент арсенал фармакологических препаратов для лечения опиоидной

наркомании принципиально новым средством, механизм действия которого связан с модулирующим влиянием на связывающую и функциональную активность опиоидных рецепторов

Способность аналога ССК-4 потенцировать анальгетический эффект морфина позволяет снижать дозу наркотика, что имеет практическое значение при использовании морфина в качестве обезболивающего средства

Положения, выносимые на защиту

Взаимодействие холецистокининовой и опиоидной систем играет существенную роль в реализации эффектов острого и хронического введения морфина

В качестве эффективных средств лечения опишной зависимости могут быть использованы препараты, модулирующие связывающую и функциональную активность опиоидных рецепторов

Апробация работы. Основные положения диссертации доложены и обсуждены на заседании межлабораторной конференции ННЦ наркологии Росздрава (Москва, июнь 2003), Российском симпозиуме по химии и биологии пептидов (Москва, ноябрь 2003), на научной конференции «Нейрохимия фундаментальные и прикладные аспекты», март 2005), на VIII-ой региональной конференции Европейского колледжа по нейропсихофармакологии (Москва, апрель 2005), на II-ом Российском симпозиуме по химии и биологии пептидов (Санкт-Петербург, май 2005), на заседании Проблемной комиссии ННЦ наркологии (Москва, апрель 2007)

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 12 научных работ

Структура и объём работы. Диссертация состоит из введения, обзора данных литературы, описания материалов и методов исследования, изложения собственных результатов и их обсуждения, заключения и выводов. Работа изложена на 130 страницах, содержит 16 таблиц и 8 рисунков. Список цитированной литературы включает 169 источников, из которых - 15 работ отечественных авторов

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Экспериментальные модели и методы исследования. Работа выполнена на 500 лабораторных крысах (самцах) породы Вистар с начальной массой 100-120 г. Модель **острой интоксикации морфином** создавали путем однократного внутрибрюшинного (в/б) введения раствора морфина гидрохлорида в дозе 5 мг/кг веса животного. Другой группе животных за 15 минут до введения морфина в/б вводили аналог ССК-4¹ в дозе 2 мкг/кг.

Для создания модели **физической зависимости от морфина** животным в течение 14 дней дважды в сутки с интервалом в 8 часов в/б вводили раствор морфина гидрохлорида в возрастающих концентрациях от 10 до 50 мг/кг веса. Во второй группе животным за 15 минут до введения морфина в/б вводили аналог ССК-4 в дозе 2 мкг/кг. **Синдром отмены морфина** провоцировали введением налоксона в дозе 2 мг/кг вместо последней инъекции морфина. Регистрацию специфических для синдрома отмены морфина поведенческих и вегетативных реакций проводили в тесте «открытое поле» в течение 45 минут. **Потребление морфина** у животных с опиоидной зависимостью оценивали в условиях свободного выбора между растворами морфина и хинина. Вначале животные с опиоидной зависимостью на протяжении двух недель получали в качестве единственного источника жидкости 0,5% раствор морфина. Далее животных в течение 10 дней тестировали в условиях свободного выбора между 0,5% раствором морфина и 0,05% раствором хинина, регистрируя суточное потребление жидкостей. По результатам тестирования животные были разделены на две группы с высокой (более 10 мг/кг веса) и низкой (менее 10 мг/кг веса) суточной дозой потребления морфина, т.е. условно на «многопьющих» и «малопьющих».

Затем животным в течение двух недель вводили аналог ССК-4 двумя способами: внутрибрюшинно (в дозе 2,0 мкг/кг) и интраназально (в дозах 5,

¹ Синтез аналога ССК-4 был выполнен сотрудниками лаборатории синтеза пептидов (рук. лаб. – канд. хим. наук Беспалова Ж.Д.) Российского кардиологического научно-производственного комплекса Росздрава (директор – академик РАН и РАМН, профессор Чазов Е.И.)

50 и 200 мкг/кг) при одновременном тестировании в условиях свободного выбора между растворами морфина и хинина После отмены препарата животных вновь тестировали в тех же условиях в течение 10 дней

Влияние аналога ССК-4 на анальгетический эффект морфина оценивалось в тесте отдергивания хвоста (тест “tail-flick”) по изменению латентного периода реакции животного (ЛПР ОХ) на болевой раздражитель Регистрация ЛПР ОХ осуществлялась в течение 90 минут с интервалом в 15 минут В первой серии экспериментов одной группе животных внутрибрюшинно (в/б) вводили аналог ССК-4 в дозе 2,0 мкг/кг, а другой – эквивалентный объем 0,9% раствор NaCl Во второй серии экспериментов животным I-ой группы в/б вводили морфин в дозе 5,0 мг/кг, животным II-ой группы морфин (5,0 мг/кг) вводили одновременно с аналогом ССК-4 (2,0 мкг/кг), животным III-ей группы вначале вводили аналог ССК-4 (2,0 мкг/кг), а через 15 минут – морфин (5 мг/кг)

В третьей серии экспериментов одной группе животных в течение 14 дней вводился морфин в возрастающей концентрации (от 5 до 50 мг/кг) Другая группа животных получала морфин по этой же схеме вместе с аналогом ССК-4, причем последний вводился в дозе 2,0 мкг/кг за 15 минут до морфина Через день после последней инъекции морфина у животных обеих групп оценивали выраженность анальгетического эффекта при остром введении морфина в дозе 15,0 мг/кг

Радиорецепторные исследования. Связывающую активность опиоидных (ОР) и холецистокининовых (ССК) рецепторов в структурах мозга определяли в мембранных препаратах отделов мозга с помощью радиорецепторного анализа В качестве лигандов ОР были использованы ³H-[D-Ala², D-Leu⁵]-энкефалин (³H-ДАДЛ) и ³H-[D-Ala², N-Me-Phe⁴, Gly⁵-ol]-энкефалин (³H-ДАГО), а в качестве лиганда ССК-рецепторов был использован ¹²⁵I-ССК-8S (Проскурякова Т В и соавт, 2005) Для оценки связывающей активности рецепторов использовали K_d (константу

диссоциации) - величину, обратную средству рецепторов к лиганду, и V_{max} , или число мест связывания лиганда

Определение базального и форсколинстимулированного уровня цАМФ в структурах мозга проводили с помощью наборов [3H]-cyclic AMP assay system (Проскуракова Т В и соавт, 2006)

Математическую обработку результатов радиорецепторного анализа проводили с помощью программы Ligand Статистическую обработку полученных данных проводили с помощью пакета программ Statgraf Достоверность различий оценивали с использованием t-критерия Стьюдента

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В результате выполненного исследования было установлено, что аналог ССК-4 не обладает анальгетическим действием, но при одновременном введении с морфином потенцирует анальгетический эффект последнего, и это действие аналога ССК-4 наиболее выражено, когда введение пептида предшествует введению морфина (рис 1) Эти данные предполагают изменение под действием аналога ССК-4 опиоидной рецепции, а, возможно, и наличие у аналога ССК-4 средства к μ – и δ - ОР, так как в реализацию анальгетического действия морфина вовлечены оба типа ОР (Rady J J et al, 2001)

В экспериментах *in vitro* было показано, что аналог ССК-4 вызывает дозозависимое ингибирование специфического связывания селективного агониста μ -ОР (3H -ДАГО) (рис 2, кривая 1) и увеличение специфического связывания селективного агониста δ -ОР (3H -ДАДЛ) (рис 2, кривая 2) Учитывая, что μ -ОР и ССК-рецепторы локализованы на одних и тех же нейронах (Gall C et al, 1987, Noble F, et al, 1993, Zhang X et al, 2000), полученные результаты, на наш взгляд, не могут рассматриваться в качестве доказательства наличия у аналога ССК-4 средства к μ -ОР Что касается специфического связывания 3H -ДАДЛ, то нам удалось доказать, что

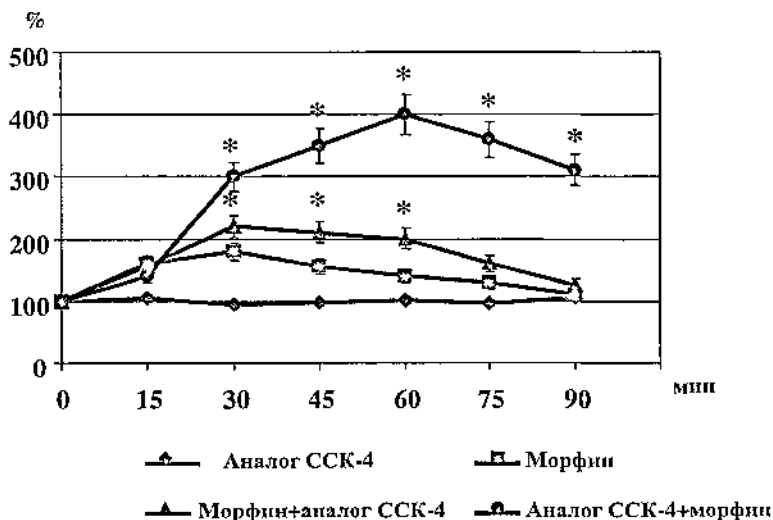


Рис. 1. Влияние аналога ССК-4 на анальгетический эффект морфина
* - достоверность различий по сравнению с животными, получавшими один морфин (n=10)

Специфическое связывание, %

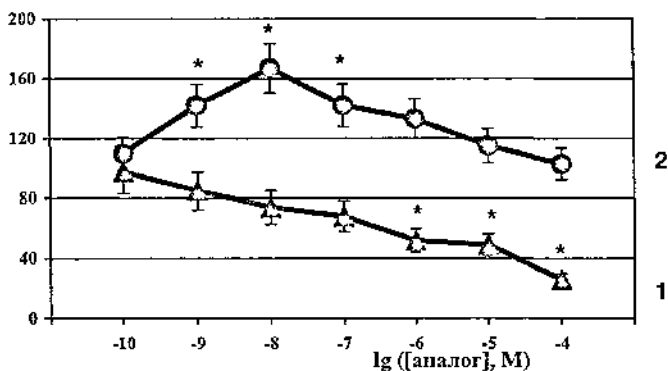


Рис. 2. Специфическое связывание агонистов μ - и δ -ОР - ^3H -ДАФО (1) и ^3H -ДАДЛ (2) *in vitro* в присутствии аналога ССК-4 * - достоверность различий по сравнению с контролем (n=5)

наблюдаемое увеличение происходит за счет возрастания количества мест его связывания

Достоверное увеличение числа мест связывания ^3H -ДАДЛ при уменьшении их сродства к лиганду во фронтальной коре и стриатуме было обнаружено и в экспериментах *in vivo* при однократном внутрибрюшинном введении разных доз аналога ССК-4, тогда как параметры связывания ^3H -ДАГО в этих структурах мозга достоверно не изменялись (табл 1)

Таблица 1. Связывающая активность агонистов μ - и δ -ОР при однократном введении аналога ССК-4

Группы животных	Стриатум		Фронтальная кора	
	K_d (нМ)	V_{\max} (фмоль/мг белка)	K_d (нМ)	V_{\max} (фмоль/мг белка)
^3H -ДАГО				
контроль	4,1±1,2	448±70	2,4±0,5	279±150
2 мкг/кг	2,4±0,2	323±76	3,5±1,8	197±33
20 мкг/кг	5,4±0,8	484±52	2,5±0,6	455±172
200 мкг/кг	4,0±0,7	248±91	4,2±1,0	274±161
^3H -ДАДЛ				
контроль	4,5±1,2	292±57	2,7±0,8	61±16
2 мкг/кг	20,1±4,5*	244±60	7,9±2,4*	465±118*
20 мкг/кг	21,9±2,4*	484±20*	12,9±2,7*	878±296*
200 мкг/кг	20,1±2,5*	1210±140*	8,0±1,7*	1151±302*

Примечание * - $p \leq 0,05$ – достоверность различий по сравнению с контрольной группой животных, каждая группа состояла из 4-5 животных

Обнаружив способность аналога ССК-4 изменять связывание агонистов μ - и δ -ОР - ^3H -ДАГО и ^3H -ДАДЛ в экспериментах *in vitro* и *in vivo*, было проведено исследование его влияния на опиоидную рецепцию при

однократном введении морфина. Для этого и дальнейших экспериментов *in vivo* нами была выбрана минимальная доза аналога ССК-4 - 2 мкг/кг веса животного, потому что при этой дозе падение сродства ^3H -ДАДЛ к местам специфического связывания было таким же, как и при 10- и 100-кратном увеличении дозы аналога ССК-4.

С помощью анализа насыщения ОР ^3H -ДАГО и ^3H -ДАДЛ было установлено, что морфин приводил к падению сродства ^3H -ДАГО к специфическим местам связывания во фронтальной коре и стриатуме (табл. 2).

Таблица 2. Влияние аналога ССК-4 на связывающую активность агонистов μ - и δ -ОР при однократном введении морфина

Группы животных	Стриатум		Фронтальная кора	
	K_d (нМ)	V_{\max} (фмоль/мг белка)	K_d (нМ)	V_{\max} (фмоль/мг белка)
^3H -ДАГО				
контроль	4,1±1,2	448±704	2,7±0,5	279±18
морфин	15,7±3,1*	393±96	5,8±1,2*	176±61
аналог ССК-4 + морфин	10,2±2,0*	365±73	18,8±2,9***	255±51
^3H -ДАДЛ				
контроль	4,51,2	292±57	2,7±0,8	61±16
морфин	7,7±1,3*	285±58	4,7±0,9	163±37*
аналог ССК-4 + морфин	9,7±2,4*	189±38	4,1±0,8	50±10**

Примечание * - $p \leq 0,05$ – достоверность различий по сравнению с контрольной группой животных, ** - $p \leq 0,05$ – достоверность различий по сравнению с группой животных, получавших морфин, каждая группа состояла из 4-5 животных

Инъекция аналога ССК-4 за 15 минут до введения морфина приводила к усилению наблюдаемого при однократном введении одного морфина падения средства ^3H -ДАГО к местам специфического связывания во фронтальной коре

При использовании в качестве лиганда ^3H -ДАДЛ наблюдаемое на фоне однократного введения морфина увеличение числа мест связывания лиганда во фронтальной коре купировалось предварительной инъекцией аналога ССК-4. В стриатуме средство ^3H -ДАДЛ к местам специфического связывания оставалось сниженным как при введении морфина, так и при сочетанном введении аналога и морфина

Таким образом, аналог ССК-4 не предотвращал изменения средства агонистов μ - и δ -ОР к специфическим местам связывания при однократном введении морфина, но нормализовал количество мест связывания ^3H -ДАДЛ во фронтальной коре. Эту способность аналога ССК-4 трудно привлечь для объяснения увеличения анальгетического эффекта морфина при его сочетанном введении с аналогом ССК-4, так как в тесте «tail-flick» реакция животного на болевой раздражитель реализуется на спинальном уровне. По-видимому, потенцирование анальгетического эффекта морфина при его сочетанном введении с аналогом ССК-4 может быть обусловлено изменениями внутриклеточных процессов, возможно, на уровне вторичных посредников

Используемая в работе схема хронического введения морфина приводила к развитию толерантности к анальгетическому действию морфина (рис 3) и формированию зависимости от морфина (рис 4)

Введение аналога ССК-4 на фоне длительной морфинизации частично предотвращало развитие толерантности к анальгетическому действию морфина (рис 3)

Основным критерием физической зависимости от морфина, как известно, является синдром отмены, который в эксперименте на животных

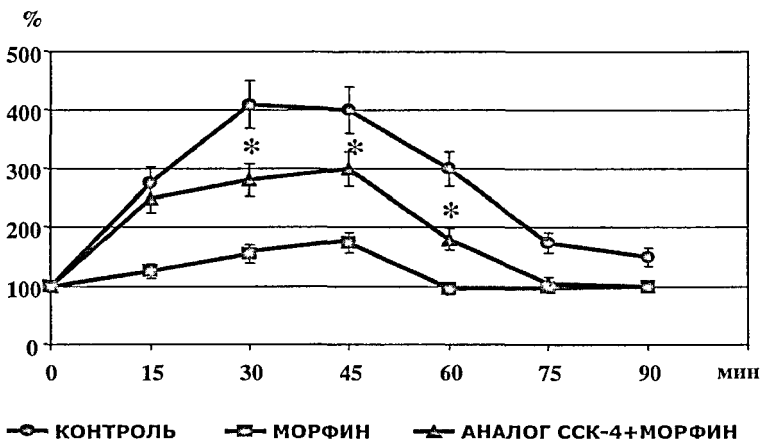
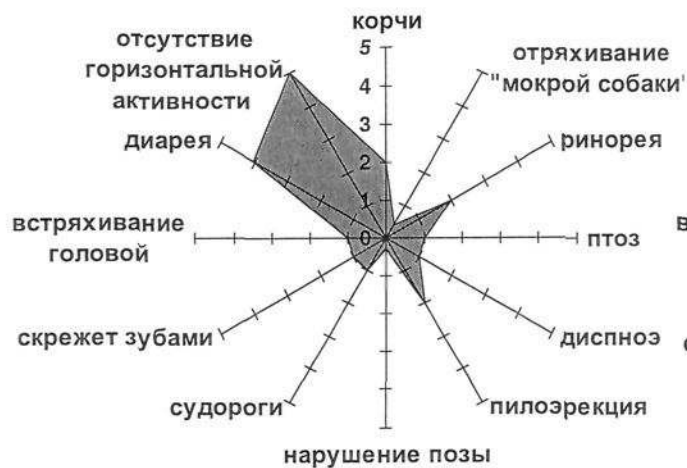


Рис. 3. Влияние аналога ССК-4 на развитие толерантности к анальгетическому эффекту морфина при длительном введении наркотика

обычно провоцируется введением налоксона у длительно морфинизированных животных реакции, специфические для синдрома отмены морфина наблюдались в первые 5 минут после введения налоксона, а суммарный показатель их выраженности составил в среднем 20 баллов (рис 4) у животных, которым на фоне морфинизации вводили аналог ССК-4, специфические для синдрома отмены реакции начинали проявляться через 30-45 минут после введения налоксона, а суммарный показатель их выраженности составил в среднем 7,0 баллов

Принято считать, что суммарный показатель выраженности реакций, специфических для синдрома отмены морфина, отражает тяжесть физической зависимости от морфина, в связи с чем полученные данные позволяют констатировать, что аналог ССК-4 при введении на фоне морфинизации более чем в два раза снижает ее тяжесть



■ -МОРФИН



□ -АНАЛОГ ССК-4 +МОРФИН

Рис. 4. Влияние аналога ССК-4 на проявление синдрома отмены морфина.

Определение параметров опиоидной рецепции у хронически морфинизированных животных показало, что во фронтальной коре и стриатуме наблюдалось снижение мест специфического связывания ^3H -ДАГО при отсутствии изменений сродства использованного лиганда к $\mu\text{-OR}$ (табл 3)

Таблица 3. Влияние аналога ССК-4 на связывающую активность агонистов ОР рецепторов при длительном введении морфина

Группы животных	Стриатум		Фронтальная кора	
	K_d (нМ)	V_{\max} (фмоль/мг белка)	K_d (нМ)	V_{\max} (фмоль/мг белка)
^3H -ДАГО				
контроль	4,1±1,2	448±70	2,4±0,6	279±18
Хроническое введение морфина				
- аналог ССК-4	6,1±0,8	183±67*	2,6±1,1	57±23*
+ аналог ССК-4	7,3±1,2	368±70	2,3±1,3	51±21*
Отмена морфина				
- аналог ССК4	6,6±1,5	140±56*	7,3±2,1*	75±28*
+ аналог ССК-4	5,0±1,9	227±97	12,0±2,0*	215±95
^3H -ДАДЛ				
контроль	4,5±0,9	292±57	2,7±0,8	61±16
Хроническое введение морфина				
- аналог ССК-4	9,9±1,3*	365±89	3,5±1,3	181±39*
+ аналог ССК-4	9,5±2,1*	544±93*	5,6±1,4	250±60*
Отмена морфина				
- аналог ССК-4	5,7±1,7	256±77	4,8±1,1	98±45
+ аналог ССК-4	6,5±1,9	258±91	2,6±0,2	155±61

Примечание * – $p \leq 0,05$ достоверность различий по сравнению с контрольной группой животных, каждая группа состояла из 4-5 животных

Введение аналога ССК-4 на фоне хронической морфинизации восстанавливало до контрольных значений только число мест связывания ^3H -ДАГО в стриатуме

Увеличение мест связывания ^3H -ДАДЛ во фронтальной коре, наблюдаемое на фоне хронической морфинизации, не изменялось после предварительной инъекции аналога ССК-4, в стриатуме отмечалось увеличение мест связывания ^3H -ДАДЛ, причем его сродство в этом отделе мозга оставалось пониженным, как и при введении одного морфина

Итак, при хроническом и однократном введении морфина обнаруживаются различия не только в изменении параметров связывания используемых в работе агонистов μ - и δ -ОР, но и в характере влияния аналога ССК-4 на связывающую активность используемых лигандов

При отмене морфина у животных сохранялось наблюдаемое при хроническом введении морфина снижение мест связывания ^3H -ДАГО во фронтальной коре и стриатуме (табл 3) Когда животным морфин вводили с аналогом ССК-4, то при отмене морфина во фронтальной коре отмечалась нормализация мест связывания ^3H -ДАГО, но сродство лиганда к местам специфического связывания оставалось пониженным При использовании ^3H -ДАДЛ отмена морфина сопровождалась нормализацией его связывающей активности как у животных, получавших один морфин, так и у крыс, которым морфин вводили в сочетании с аналогом ССК-4

Таким образом, развитие опиной зависимости при длительном введении морфина приводит к снижению числа μ -ОР во фронтальной коре и стриатуме, а также к увеличению числа δ -ОР во фронтальной коре и падению сродства δ -ОР к лиганду в стриатуме Аналог ССК-4, вводимый на фоне хронической морфинизации, снижает тяжесть опиной зависимости, о чем свидетельствует менее выраженный синдром отмены морфина Полученные результаты позволяют связывать снижение тяжести опиной зависимости с увеличением δ -ОР и нормализацией числа μ -ОР в стриатуме, а менее

выраженный синдром отмены - с нормализацией числа μ -ОР во фронтальной коре

Определение параметров холецистокининовой рецепции с использованием в качестве лиганда ^{125}I -ССК8S показало, что у хронически морфинизированных животных во фронтальной коре и гипоталамусе наблюдалось снижение мест связывания ^{125}I -ССК8S при увеличении средства ^{125}I -ССК8S к ССК-рецепторам в гипоталамусе (табл 4) Аналогичные результаты были получены и у животных, которым на фоне хронической морфинизации вводился аналог ССК-4

Таблица 4. Влияние аналога ССК-4 на связывающую активность ССК-рецепторов на фоне длительного введения морфина и в период его отмены

Группы животных	Гипоталамус		Фронтальная кора	
	K_d (нМ)	V_{\max} (пмоль/мг белка)	K_d (нМ)	V_{\max} (пмоль/мг белка)
^{125}I -ССК8S				
контроль	9,9±1,0	0,33±0,01	4,1±0,3	31,7±4,1
Хроническое введение морфина				
- аналог ССК-4	3,3±0,4*	0,11±0,02*	4,0±0,4	19,9±3,9*
+ аналог ССК-4	3,5±0,5*	0,15±0,04*	7,9±0,7	15,3±2,7*
Отмена морфина				
- аналог ССК-4	25,6±2,3*	1,80±0,09*	8,0±0,2*	33,9±4,3
+ аналог ССК-4	13,6±1,9	0,63±0,08*	5,9±1,7	25,0±2,6

Примечание * – $p \leq 0,05$ достоверность различий по сравнению с контрольной группой животных, каждая группа состояла из 6-8 животных

При отмене морфина у животных наблюдалось падение средства ^{125}I -ССК8S к ССК-рецепторам во фронтальной коре и гипоталамусе Во фронтальной коре падение средства ^{125}I -ССК8S к ССК-рецепторам

происходило на фоне нормализации мест связывания ^{125}I -ССК8S, а в гипоталамусе – на фоне увеличения мест связывания ^{125}I -ССК8S. При отмене морфина после длительного сочетанного введения аналога ССК-4 и морфина во фронтальной коре и гипоталамусе наблюдалось восстановление сродства ^{125}I -ССК8S к ССК-рецепторам. При этом во фронтальной коре происходила нормализация мест связывания ^{125}I -ССК8S, а в гипоталамусе – снижение мест связывания ^{125}I -ССК8S, правда, не до контрольных значений.

Согласно данным литературы, ССК- и опиоидные рецепторы локализованы на одном и том же нейроне, а в качестве одного из вторичных внутриклеточных посредников выступает цАМФ. Если активация ОР инициирует снижение образования цАМФ, то при активации ССК1-рецепторов образование цАМФ увеличивается (De la Fuente M et al, 1998). Учитывая, что аналог ССК-4 обладает выраженным сродством к ССК1-рецепторам (Проскурякова Т В, 2000), важно было выяснить, каким образом изменяется уровень цАМФ при сочетанном введении аналога ССК-4 и морфина. Важность этого исследования обусловлена тем, что образование цАМФ является показателем функциональной активности рецепторов.

При определении базального и форсколинстимулированного уровня цАМФ было обнаружено, что при однократном введении морфина снижение форсколинстимулированного уровня цАМФ наблюдается только в гипоталамусе, а при хроническом введении морфина – только в стриатуме (рис. 5). Особого внимания заслуживает выявленное в работе повышение форсколинстимулированного уровня цАМФ в стриатуме и фронтальной коре на фоне хронического сочетанного введения аналога ССК-4 и морфина и при последующей отмене морфина.

Учитывая тот факт, что введение аналога ССК-4 предшествовало введению морфина, эти результаты дают основание предполагать, что аналог ССК-4, связываясь с ССК1-рецепторами, вызывает конформационные

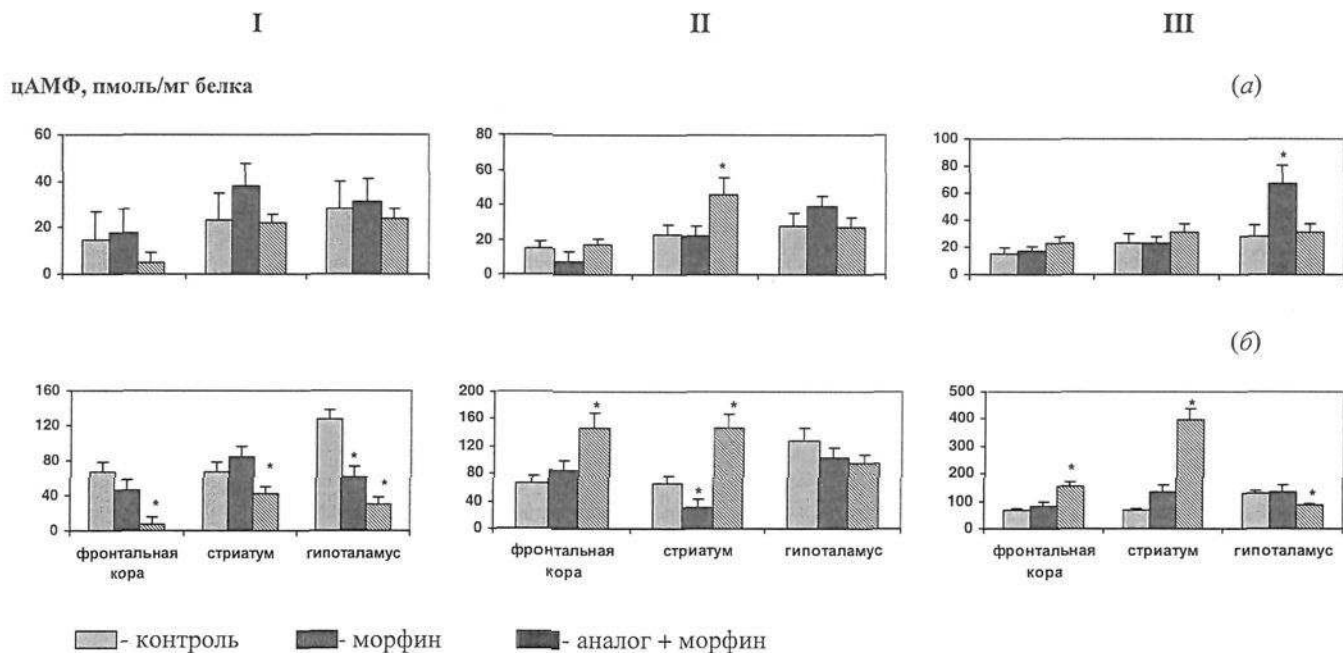


Рис. 5. Базальный (а) и форсколинстимулированный (б) уровень цАМФ в отделах мозга у животных на фоне однократного (I) и хронического (II) введения аналога ССК-4 и морфина, и через 48 ч после отмены морфина и аналога ССК-4 (III); * - $p \leq 0,05$ – достоверность различий по сравнению с соответствующей группой контрольных животных.

изменения ОР и, тем самым, изменяет внутриклеточные процессы, развивающиеся при последующей активации ОР морфином Эти изменения можно рассматривать как один из механизмов предотвращения развития толерантности к анальгетическому эффекту морфина и снижения тяжести физической зависимости от морфина при хроническом сочетанном введении аналога ССК-4 и морфина

Оценка влияния аналога ССК-4 на потребление морфина у животных с опиоидной зависимостью осуществлялась в условиях свободного выбора между растворами морфина и хинина У животных с низкой дозой потребления морфина ($3,3 \pm 0,4$ мл) при в/б введении аналога ССК-4 в дозе 2 мкг/кг потребление морфина снижалось до $1,5 \pm 0,2$ мл ($p \leq 0,05$), а после прекращения введения пептида – до $0,7 \pm 0,3$ мл ($p \leq 0,05$) У животных с высокой суточной дозой потребления морфина ($15,8 \pm 2,1$ мл) при в/б введении аналога ССК-4 потребление морфина снижалось до $10,3 \pm 3,6$ мл, а после прекращения введения пептида – до $8,3 \pm 0,9$ ($p \leq 0,05$)

При интраназальном введении аналог ССК-4 вводили в дозах 5, 50 и 200 мкг/кг веса Нам не удалось выявить изменений в потреблении морфина у животных с высокой суточной дозой потребления наркотика ни при одной из используемых доз аналога ССК-4, а также после прекращения введения пептида У животных с низкой суточной дозой потребления морфина при интраназальном введении аналога ССК-4 отмечалась тенденция к снижению потребления морфина, а после прекращения введения аналога ССК-4 – достоверное снижение потребления морфина При этом у животных, получавших аналог ССК-4 в дозе 5 мкг/кг, потребление морфина снижалось более чем в 4 раза, у животных, получавших аналог ССК-4 в дозе 50 мкг/кг, - более чем в 8 раз, а у животных, получавших аналог ССК-4 в дозе 200 мкг/кг - более чем в 6 раз Эти результаты дают основание заключить, что аналог ССК-4 при интраназальном введении снижает потребление морфина только у животных с низкой суточной дозой потребления наркотика Этот эффект

аналога ССК-4 наиболее выражен после прекращения введения пептида у животных, получавших аналог ССК-4 в дозе в 50 мкг/кг

Обращает внимание, что при внутрибрюшинном способе введения ингибирующее действие аналога ССК-4 на потребление морфина не зависит от индивидуальной чувствительности животных к наркотику, тогда как при интраназальном введении аналог ССК-4 снижает потребление морфина только у животных с высокой чувствительностью к наркотику

Таким образом, анализ полученных результатов в сопоставлении с известными данными литературы свидетельствует, что взаимодействие ССК- и опиоидной систем в условиях действия морфина играет важную роль в развитии основных симптомов опиоидной зависимости, а в качестве эффективных средств лечения опиоидной зависимости могут использоваться препараты, механизм действия которых связан с модулирующим влиянием на связывающую и функциональную активность опиоидных рецепторов

ВЫВОДЫ

1 В экспериментах *in vitro* аналог ССК-4 ингибирует специфическое связывание селективного агониста μ -рецепторов и увеличивает специфическое связывание селективного агониста δ -рецепторов, что свидетельствует о его модуляторном действии на опиоидную рецепцию

2 Аналог ССК-4 предотвращает наблюдаемое при однократном введении морфина увеличение числа δ -рецепторов и усиливает падение сродства μ -рецепторов во фронтальной коре

3 При формировании зависимости от морфина и толерантности к его анальгетическому эффекту наблюдается снижение числа μ -рецепторов во фронтальной коре и стриатуме, увеличение числа δ -рецепторов во фронтальной коре и падение сродства δ -рецепторов в стриатуме

4 Аналог ССК-4, вводимый на фоне хронической морфинизации, частично предотвращает развитие толерантности к анальгетическому эффекту морфина и снижает тяжесть опиоидной зависимости, что

сопровождается нормализацией числа μ -рецепторов и увеличением числа δ -рецепторов в стриатуме

5 Аналог ССК-4 снижает у животных с опиоидной зависимостью потребление морфина в условиях свободного выбора, при этом уменьшается как суточная доза морфина, так и индекс предпочтения

6 При хроническом введении морфина изменяются параметры связывания ССК-рецепторов во фронтальной коре и гипоталамусе. Действие аналога ССК-4, вводимого на фоне хронической морфинизации, проявляется только при отмене морфина и выражается в нормализации сродства ССК-рецепторов во фронтальной коре и гипоталамусе и снижении числа ССК-рецепторов в гипоталамусе

7 Увеличение форсколинстимулированного уровня цАМФ в стриатуме и фронтальной коре при введении аналога ССК-4 на фоне хронической морфинизации может свидетельствовать об изменении под действием пептида внутриклеточных процессов, развивающихся при активации опиоидных рецепторов, вследствие чего изменяется их функциональная активность

8 Полученные результаты позволяют рассматривать аналог ССК-4 как принципиально новое средство для лечения опиоидной зависимости, так как механизм его действия связан с модулирующим влиянием на связывающую и функциональную активность опиоидных рецепторов

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ:

1 Проскурякова Т В , Панкратова Н В , Петриченко О Б , Шохонова В А , Анохина И П Влияние аналога тетрапептида холецистокинина на анальгетический эффект морфина // Нейрохимия - 2003 - Т 20 - №1 - С 28-34

2 Проскурякова Т В , Панкратова Н В , Петриченко О Б , Шохонова В А , Анохина И П Влияние аналога холецистокинина на поведенческие и нейрохимические эффекты морфина // Тезисы докладов 2-ого съезда Российского Научного Общества фармакологов «Фундаментальные проблемы фармакологии» – Москва - 2003 – ч II - С 99

- 3 Проскурякова Т В , Панкратова Н В , Петриченко О Б , ШохONOва В А , Анохина И П Оценка эффективности использования аналога тетрапептида холецистокинина у животных для подавления влечения к морфину и снижения тяжести физической зависимости от него // Росс псих Журнал - 2003 - № 6 - С 55-58
- 4 Анохина И П , Проскурякова Т В , Беспалова Ж Д , Палькеева М Е , Петриченко О Б , ШохONOва В А Фармакологическая активность аналога тетрапептида холецистокинина // Российский Симпозиум по химии и биологии пептидов Тезисы докладов и стендовых сообщений Москва - 2003 – С 87
- 5 Проскурякова Т В , Панкратова Н В , Петриченко О Б , ШохONOва В А , Палькеева М Е , Беспалова Ж Д , Анохина И П Биологическая активность холецистокинин-(30-33)-тетрапептида // Биоорганическая химия - 2005 - Т 31 - № 2 - С 130-139
- 6 Anokhina I P , Proskuryakova T V , Petrichenko O B , Shokhonova V A Mechanism of CCK-4 analogue activity in morphine-dependent rats // Eur Neuropsychopharmacology - 2005 - V 15 - S 2 - P S264
- 7 Проскурякова Т В , Петриченко О Б , ШохONOва В А Аналог CCK-4 модулирует связывающую активность опиоидных рецепторов у животных со сформированной толерантностью к морфину // Нейрохимия фундаментальные и прикладные аспекты Тезисы докладов и стендовых сообщений – Москва - 2005 - С 119
- 8 Анохина И П , Проскурякова Т В , Беспалова Ж Д , Палькеева М Е , Петриченко О Б , ШохONOва В А Влияние аналога тетрапептида холецистокинина на опиоидную рецепцию в условиях острого и хронического введения морфина // II Российский Симпозиум по химии и биологии пептидов Тезисы докладов и стендовых сообщений - С -Петербург - 2005 - С 11
- 9 Проскурякова Т В , Петриченко О Б , ШохONOва В А Холецистокининовые и опиоидные рецепторы мозга при длительном введении морфина и в условиях его отмены // Нейрохимия - 2005 - Т 22 - № 2 - С 123-127
- 10 Проскурякова Т В , Панкратова Н В , Петриченко О Б , ШохONOва В А , Гарстукова Л Г , Анохина И П Использование аналога тетрапептида холецистокинина для подавления основных признаков зависимости от морфина у животных // Сб научных трудов «Современные проблемы наркологии» – Москва - 2005 - С 52-62
- 11 Анохина И П , Проскурякова Т В , Беспалова Ж Д , Палькеева М Е , Петриченко О Б , ШохONOва В А Влияние аналога тетрапептида холецистокинина на опиоидную рецепцию в условиях острого и хронического введения морфина // Биоорганическая химия - 2006 - Т 32 - № 3 - С 285-292
- 12 ШохONOва В А , Петриченко О Б , Проскурякова Т В Взаимодействие холецистокининовой и опиоидной систем в условиях действия морфина // Наркология - 2007 - № 2 - С 49-55

Подписано в печать 23 04 2007
Формат 60x90/16 Усл печ л 1,5 Тираж 100 экз
Заказ №64-04

Отпечатано в ООО "Центр полиграфических услуг "Радуга"
115280, г Москва, ул Автозаводская, 25
Тел 739-56-80, www.raduga-print.ru