

Экспериментальная оценка влияния ладастена и ГБ-115 на развитие толерантности к анальгетическому действию морфина

Константинопольский М.А., Чернякова И.В., Колик Л.Г.

ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова», г. Москва

Резюме. Изучено влияние пептидного анксиолитика ГБ-115 и психостимулятора с анксиолитическим действием ладастена на формирование толерантности к опиатам на белых крысах-самцах. Развитие толерантности оценивали по выраженности анальгетического эффекта морфина (2,0 мг/кг/5 дней, 2 раза в день) при его внутрибрюшинном (в/б) введении в иммерсионном тесте «отдергивание хвоста». Показано, что ладастен (50,0 мг/кг, в/б) *per se* при однократном и субхроническом введении не влиял на пороги болевой реакции и не препятствовал формированию толерантности к морфину на 5-й день эксперимента. Напротив, ГБ-115 (0,1 мг/кг, в/б) *per se* при однократном и субхроническом введении статистически значимо повышал болевые пороги у крыс и препятствовал развитию толерантности к анальгетическому эффекту морфина.

Ключевые слова: ладастен, ГБ-115, толерантность к морфину, анальгезия, крысы

Experimental assessment of ladasten and GB-115 effects on the antinociceptive tolerance to morphine

Konstantinopolsky M.A., Chernyakova I.V., Kolik L.G.
FSBI «Zakusov Institute of Pharmacology», Moscow

Abstract. The development of morphine-induced antinociceptive tolerance limits its therapeutic efficacy in pain management. Effects of non-benzodiazepine anxiolytics ladasten and GB-115 on the development of antinociceptive tolerance to morphine were studied in albino male rats. The tolerance was induced by daily sub-chronic administration of morphine (2,0 mg/kg, i.p., twice daily for 5 days) and assessed in immersion tail-flick test on days 1 and 5. Concomitant sub-chronic administration of dipeptide anxiolytic GB-115 (0,1 mg/kg/5 days, i.p.), developed on the base of endogenous tetrapeptide cholecystokinin (CCK), followed by morphine (2,0 mg/kg), reversed the antinociceptive tolerance to morphine on day 5. GB-115 *per se* at the same anxiolytic dose demonstrated a short-term analgesic activity on days 1 and 5. In contrast, 2-aminoadamantane derivative Ladasten (50,0 mg/kg/5 days, i.p.) with psychostimulant and anxiolytic activity, failed to do so. Ladasten at dose employed in the study, did not exert any effects on pain threshold on days 1 and 5. Our results suggest that in this well-characterized model of acute somatic pain, the development of tolerance to the antinociceptive effect of systemic morphine can be prevented by co-administration with GB-115.

Keywords: ladasten, GB-115, tolerance to morphine, antinociception, rats

Автор, ответственный за переписку:

Константинопольский Марк Александрович – ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова», 125315, Москва, ул. Балтийская, д. 8; тел. +7 (495) 601-22-43; e-mail: makonstant.24@mail.ru

Введение

В настоящее время для купирования болевых синдромов продолжают использовать наркотические анальгетики, однако формирование толерантности к анальгетическому действию опиатов является одной из причин, ограничивающих их клиническое применение. В фармакотерапии больных, наряду с устранением болевой симптоматики, широко применяют психотропные препараты, поскольку около 10–30% пациентов с хроническими болевыми синдромами находятся в состоянии психологического дистресса, для преодоления которого назначают быстро действующие бензодиазепиновые (БД) транквилизаторы (диазепам, лоразепам, оксазепам) [1]. С другой стороны, во всем мире наблюдается экстенсивный рост числа больных с опиатной зависимостью, принимающих одновременно препараты БД ряда [2, 3], что значительно увеличивает риск внезапной смерти от пере-

дозировки опиатами [4, 5]. Отмеченное взаимодействие лекарственных препаратов может определяться фармакокинетическим и/или фармакодинамическим взаимодействием. Так, клиренс морфина зависит от активности УДФ-глюкуронилтрансферазы (УДФ-ГТ), преимущественно фермента УДФ-ГТ2В7, который метаболизирует морфин до морфин-3-глюкуронида (без анальгетического действия) и морфин-6-глюкуронида (с выраженным анальгетическим действием) [6]. Препараты, угнетающие УДФ-ГТ, способны влиять на фармакокинетику морфина и его глюкуронидов, приводя к изменению анальгетической активности и повышению риска возникновения побочных эффектов. Диазепам, лоразепам и оксазепам ингибируют УДФ-ГТ, при этом лоразепам и оксазепам сами являются субстратами для УДФ-ГТ2В7 [6], что не исключает возможность фармакокинетического взаимодействия морфина и БД. По данным экспериментальных исследований, диазепам в анксиолитических

дозах снижает развитие толерантности к морфину [7], и данный эффект устраняется при предварительной блокаде ГАМКА-рецепторов бикикуллином [8], что свидетельствует о вовлеченности ГАМК-ергической системы в механизм формирования «привыкания» к морфину. Таким образом, разработка новых безопасных препаратов с анксиолитическим действием и их возможное применение в качестве адъювантов при фармакотерапии наркотическими анальгетиками является актуальным направлением в экспериментальной фармакологии.

В ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова» синтезированы и фармакологически изучены новые анксиолитики, не являющиеся лигандами ГАМКА-рецепторов — антиастеническое средство с анксиолитическим компонентом ладастен и пептидный анксиолитик ГБ-115. Клиническая эффективность ладастена и отсутствие у него «синдрома отмены» были доказаны у больных с неврастенией [9]. Синтезированный на основе структуры эндогенного регуляторного нейропептида холецистокинина-4 (ХЦК-4) ГБ-115 как антагонист ХЦК-рецепторов продемонстрировал высокую анксиолитическую активность у животных с повышенным уровнем тревожности, а также отсутствие толерантности и формирования «синдрома отмены» при продолжительном использовании [10, 11]. Однако данные о фармакодинамическом взаимодействии ладастена и ГБ-115 с наркотическими анальгетиками при субхроническом введении в настоящее время отсутствуют.

Цель работы — изучить влияние ладастена и ГБ-115 на формирование толерантности к анальгетическому действию морфина у крыс.

Методы исследования

Экспериментальное исследование было выполнено на 80 беспородных белых крысах-самцах массой 240–280 г. (питомник «Столбовая»). Животных содержали в условиях вивария в стандартных пластиковых клетках размером 35 × 55 × 20 см по 10 особей при свободном доступе к стандартному корму и воде и естественной освещенности в течение недели до начала эксперимента в соответствии с приказом МЗ РФ № 708н от 23.08.2010 «Об учреждении Правил лабораторной практики». С целью снижения уровня стресса в ходе эксперимента в течение 3–4 дней до начала тестирования с каждым животным выполняли процедуру «хэндлинга» продолжительностью 2–3 мин.

В эксперименте использовали наркотический анальгетик морфина гидрохлорид (субстанция, 2,0 мг/кг, 2 раза в сутки, 5 суток) и антиастеническое средство ладастен (N-(2-адамантил)-N-(пара-бромфенил)амин, субстанция, 50,0 мг/кг) в виде водного раствора, пептидный анксиолитик ГБ-115 (амид N-фенил-гексаноил-глицил-L-триптофана, субстанция, 0,1 мг/кг) в виде водно-твиновой суспензии и воду для инъекций

в качестве контроля. Все вещества вводили внутривенно из расчета 0,1 мл/100 г массы животных. Выбор доз изучаемых препаратов основан на данных литературы и ранее полученных результатах [11–14].

Для оценки влияния исследуемых веществ на болевые пороги у крыс использовали иммерсионный тест «отдергивание хвоста» (tail flick), описанный ранее [12]. Установка для регистрации болевых порогов представляла собой плексигласовый контейнер с водой, температура которой в ходе эксперимента поддерживалась на уровне $55,0 \pm 0,2$ °C. В контейнер погружали индивидуальные пробирки объемом 10–15 мл, заполненные водой той же температуры. При измерении латентного периода реакции «отдергивания хвоста» дистальную треть хвоста крысы погружали в пробирку с подогретой водой и с помощью секундомера регистрировали время реакции. Максимальное время реакции составляло 30 с. Исходные средние показатели болевых порогов для каждого животного определяли на основании 4 измерений с интервалом в 10 мин, среднее значение для каждого животного принимали за 100%. Морфина гидрохлорид вводили через 60 мин после инъекций ладастена и через 30 мин после введения ГБ-115. Анальгетический эффект регистрировали в 1-е и 5-е сут. эксперимента однократно (в секундах) через 30, 45 и 60 мин после введения изучаемых препаратов и выражали в процентах относительно исходного уровня болевой чувствительности (100%). Разность между значениями болевых порогов в 1-й и 5-й дни эксперимента, выраженная в % для каждой группы животных, представляла собой изменение толерантности во времени. Сравнение соответствующих показателей для группы «морфин» (активный контроль) и каждой из опытных групп показывала наличие или отсутствие толерантности по данному эффекту в сравнении с группой «морфин». Статистическую обработку результатов проводили с помощью однофакторного дисперсионного анализа ANOVA и *t*-test для независимых групп и тест Вилкоксона для зависимых групп.

Результаты и обсуждение

Влияние ладастена на развитие толерантности к морфину

Ладастен в эффективной дозе 50 мг/кг *per se* не проявлял антиноцицептивной активности как при однократном, так и при субхроническом введении, и не влиял на индуцированную морфином анальгезию в 1-й день, при этом уровни порогов для групп «морфин» и «ладастен+морфин» практически совпадали к 45-й минуте (241 и 245%, соответственно, рис. 1 А-В). На 5-й день эксперимента наблюдалось развитие толерантности к морфину при тестировании через 30 мин после введения анальгетика. Через 45 и 60 мин после введения эффект морфина сохранялся, но был заметно снижен относительно 1-го дня:

на 45-й мин — 241% в 1-й день и 168% в 5-й день (снижение на 73%, $p < 0,05$); на 60-й мин — 225% в 1-й день и 158% в 5-й день (снижение на 67%, $p > 0,05$, рис. 1 Б-В). При сочетанном введении с морфином ладастен усиливал развитие толерантности к морфину только в узком временном интервале — через 45 мин после введения анальгетика (падение на 113%, $p < 0,01$) при сопоставлении латентных периодов реакции 1-го и 5-го дней эксперимента. При сочетанном введении ладастена с морфином на 30-й и 60-й мин усиления толерантности не отмечалось ($p > 0,05$). Следует отметить, что отличия в выраженности эффектов между группами «морфин» и «ладастен + морфин» не были статистически значимы на 5-й день на временном интервале 30–60 мин (рис. 1А-В). Ладастен статистически недостоверно усиливал развитие толерантности к морфину на 45-й и 60-й мин (падение на 36 и 26%, соответственно, $p > 0,05$) (рис. 1Б-В).

Влияние ГБ-115 на развитие толерантности к морфину

ГБ-115 в анксиолитической дозе 0,1 мг/кг *per se* демонстрировал кратковременную анальгетическую активность, которая проявлялась только через 30 мин после введения как при однократном, так и при субхроническом введении (рис. 2А), что выражалось в увеличении латентного периода реакции на 38% ($p < 0,05$) в сравнении с контрольной группой в 1-й день и на 31% ($p < 0,05$) на 5-й день. Через 45 и 60 мин после введения данный эффект отсутствовал (рис. 2Б-В). Морфин вызывал увеличение болевых порогов в 1-й день до 134, 162 и 155%, соответственно, через 30, 45 и 60 мин после его введения ($p < 0,05$; рис. 2А-В). Эффект толерантности к морфину хорошо заметен на 5-й день эксперимента, когда значения порогов болевой реакции у животных не отличались от контрольных значений: через 30 мин (контроль — 79%, морфин — 68%), через 45 мин (контроль — 87%, морфин — 111%, $p > 0,05$) и 60 мин (контроль — 89%, морфин — 117%, $p > 0,05$) после введения морфина (рис. 2А-В).

В 1-й день при совместном применении ГБ-115 с морфином (группа «ГБ-115+морфин») через 30 мин после введения последнего отмечалось увеличение болевых порогов на 23% ($p > 0,05$) по сравнению с действием морфина (рис. 2А). Через 45 и 60 мин после введения морфина ГБ-115 при предварительном введении не влиял на значения ноцицептивной реакции у крыс (рис. 2Б-В). На 5-й день при совместном применении ГБ-115 с морфином при тестировании через 30 и 45 мин после введения опиата регистрировали статистически значимое увеличение болевых порогов на 49% и 22%, соответственно, по сравнению с группой «морфин» и контрольной группой ($p < 0,05$, $p < 0,05$; рис. 2А-Б), на 60-й мин отмечалось статистически значимое увеличение латентного периода реакции только по сравнению с контрольной группой (на 39%, $p < 0,05$; рис. 2В), что указывает на способность ГБ-115

при субхроническом системном введении препятствовать формированию толерантности к анальгетическому действию морфина.

В настоящей работе впервые проведено исследование лекарственного взаимодействия ладастена, применяемого в клинической практике для фармакотерапии больных с невралгией с наркотическим анальгетиком при субхроническом введении. В иммерсионном тесте при термическом раздражении ноцицепторов на спинальном уровне показано, что ладастен, лишенный самостоятельной анальгетической активности, не оказывал влияния на эффекты морфина при однократном введении и не препятствовал формированию толерантности к опиату. Поскольку основной компонент центрального нейротропного действия ладастена обусловлен дофамин-позитивной активностью [13, 14], полученные данные согласуются с известным фармакологическим профилем ладастена, не связанным непосредственно с механизмами формирования толерантности к морфину, один из которых опосредован изменением функциональной активности опиоидной системы, а именно интернализацией и десенситизацией опиоидных рецепторов, а другой — активацией NMDA-рецепторов [15]. Выявленное отсутствие взаимодействия ладастена с морфином отличается от свойств амантадина, другого производного 2-аминоадамантина, который значительно снижал использование фентанила и морфина в пред- и постоперационный период [16], что, по-видимому, объясняется антагонистическими свойствами амантадина по отношению к NMDA-рецепторам. В. Вужак-Giżycka et al. (2012) поддерживают концепцию фармакодинамического взаимодействия лекарственных препаратов, исключая влияние амантадина на метаболизм морфина [16].

В отличие от ладастена дипептид ГБ-115 с анксиолитическим действием продемонстрировал кратковременную анальгетическую активность *per se* и препятствовал развитию толерантности к анальгетическому эффекту морфина. Настоящее исследование согласуется с ранее полученными результатами об отсутствии выраженного влияния ГБ-115 при однократном введении в диапазоне анксиолитических доз на морфин-индуцированную анальгезию в тесте «tail-flick» у мышей [17] и соответствует представлениям о его первичных фармакологических мишенях, одной из которых является ХЦК1-рецептор [10, 18]. Участие нейропептида ХЦК как физиологического антагониста эндогенных опиоидов в формировании толерантности к анальгетическому действию морфина доказано при местном введении опиата в прилежащее ядро [19]. В работе J. Y. Xie et al., выполненной с помощью микродиализа, показано, что морфин при субхроническом введении вызывает 5-кратное увеличение базального содержания ХЦК в ростральном вентромедиальном отделе продолговатого мозга [20], следовательно, усиление эндогенной активности ХЦК в ЦНС во время

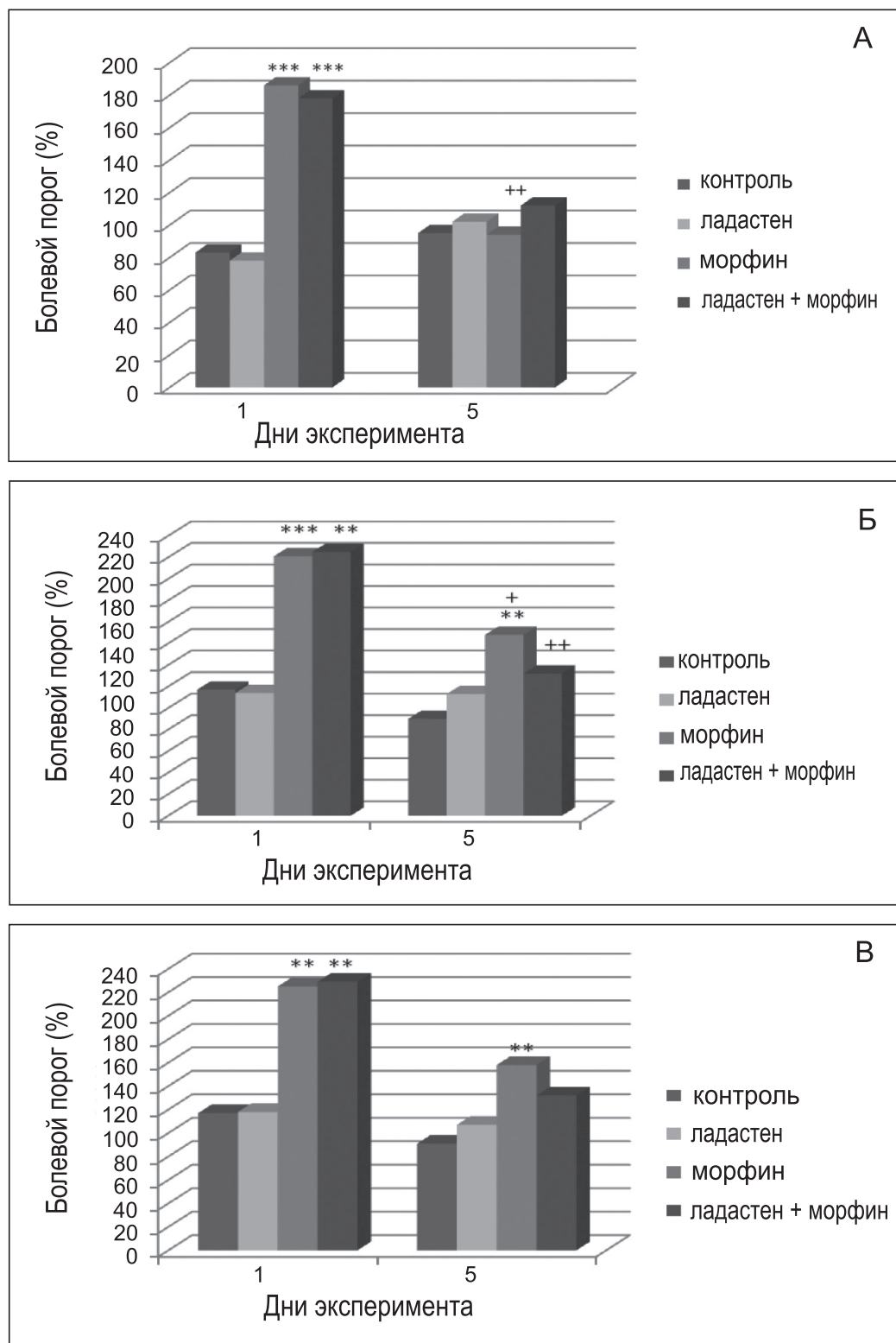


Рис. 1. Влияние ладастена на развитие толерантности к анальгетическому действию морфина у крыс в иммерсионном тесте: А – 30 мин, Б – 45 мин, В – 60 мин после введения анальгетика. **Примечание:** ** – $p < 0,01$; *** – $p < 0,005$ в сравнении с контрольной группой; + – $p < 0,05$; ++ – $p < 0,01$ в сравнении с показателями той же группы в 1-й день; в каждой группе по 10 животных, данные представлены как средние значения для групп в %

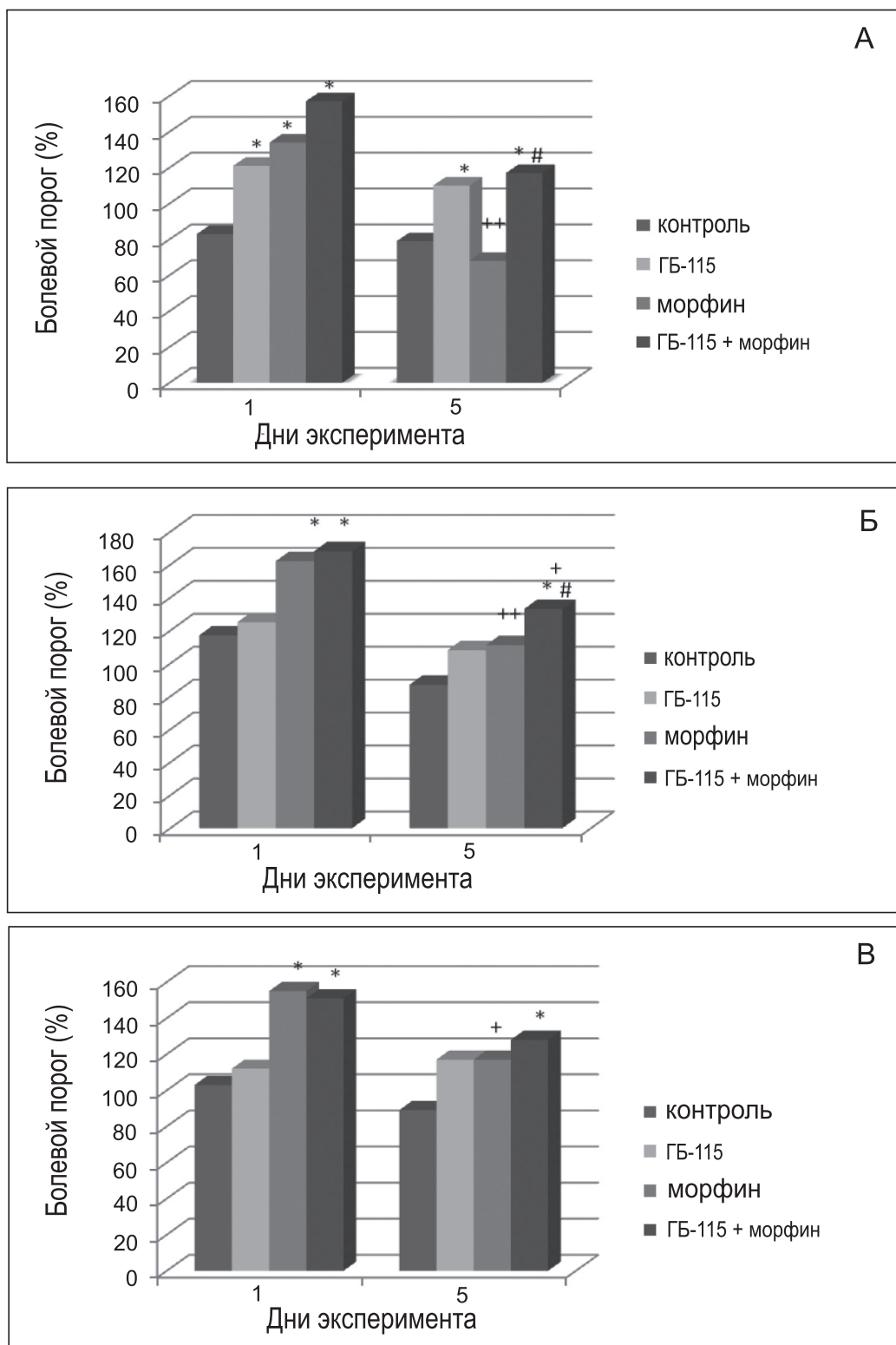


Рис. 2. Влияние ГБ-115 на развитие толерантности к анальгетическому действию морфина у крыс в иммерсионном тесте: А — 30 мин, Б — 45 мин, В — 60 мин после введения анальгетика.
Примечание: * — $p < 0,05$ в сравнении с контрольной группой; # — $p < 0,05$ в сравнении с группой «морфин»; + — $p < 0,05$; ++ — $p < 0,01$ в сравнении с показателями той же группы в 1-й день эксперимента; в каждой группе по 10 животных, данные представлены как средние значения для групп

продолжительного использования морфина может ослаблять спинальную ноцицепцию за счёт активации нисходящих эфферентных путей в сторону снижения болевой чувствительности. Эффективность антагонистов центральных ХЦК-рецепторов в отношении развития и проявления «привыкания» к морфину описана во многих работах [19–21], что позволяет рассматривать блокаду ХЦК-рецепторов как одну из стратегий снижения эскалации доз наркотических анальгетиков при купировании хронических болевых синдромов.

Таким образом, результаты исследования, с одной стороны, расширяют представления о возможном лекарственном взаимодействии антиастенического средства ладастена при субхроническом введении с наркотическим анальгетиком, с другой — открывают новые перспективы для дальнейшего изучения

в рамках клинических испытаний пептидного анксиолитика ГБ-115, сочетающего анксиолитические, анальгетические и антиаддиктивные свойства.

Выводы

1. Ладастен в дозе 50,0 мг/кг *per se* при системном однократном и субхроническом введении не влияет на пороги болевой реакции у крыс и не препятствует формированию толерантности к морфину в иммерсионном тесте.

2. ГБ-115 в дозе 0,1 мг/кг *per se* при системном однократном и субхроническом введении кратковременно повышает болевые пороги у крыс и препятствует развитию толерантности к анальгетическому эффекту морфина.

Литература

1. Uchitomi Y., Mikami I., Nagai K. et al. Depression and psychological distress in patients during the year after curative resection of non-small-cell lung cancer. *J. Clin. Oncol.* 2003; 21: 69–77.
2. Brands B., Blake J., Marsh D.C. et al. The impact of benzodiazepine use on methadone maintenance treatment outcomes. *J Addict Dis.* 2008; 27: 37–48.
3. Griffiths R.R., Wolf B. Relative abuse liability of different benzodiazepines in drug abusers. *J Clin Psychopharmacol.* 1990; 40: 237–243.
4. Lai S.H., Yao Y.J., Lo D.S.T. A survey of buprenorphine related deaths in Singapore. *Forensic Sci Int.* 2006; 162: 80–86.
5. Jones A.W., Holmgren A., Ahlner J.J. Blood methadone concentrations in living and deceased persons: variations over time, subject demographics, and relevance of coingested drugs. *Anal Toxicol.* 2012; 36: 1: 12–8.
6. Hara Y., Nakajima M., Miyamoto K., Yokoi T. Morphine glucuronosyltransferase activity in human liver microsomes is inhibited by a variety of drugs that are co-administered with morphine. *Drug Metab. Pharmacokinet.* 2007; 22: 2: 103–12.
7. Sribanditmongkol P., Sheu M.J., Tejwani G.A. Inhibition of morphine tolerance and dependence by diazepam and its relation to the CNS Met-enkephalin levels. *Brain Res.* 1994; 645: 1–2: 1–12.
8. Hull L.C., Gabra B.H., Bailey C.P. et al. Reversal of Morphine Analgesic Tolerance by Ethanol in the Mouse. *J Pharmacol Exp Ther.* 2013; 345: 512–519.
9. Незнамов Г.Г., Сюняков С.А., Телишова Е.С. и др. Новый препарат со стимулирующими и анксиолитическими свойствами ладастен при лечении невралгии (результаты сравнительного клинического исследования с плацебо). *Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова.* 2009; 109: 5: 20–26.
10. Колик Л.Г., Гудашева Т.А., Середенин С.Б. Об участии холецистокининовой системы в реализации анксиолитических эффектов дипептида ГБ-115. *Бюлл. Экспер. Биол. и мед.* 2012; 153: 6: 828–832.
11. Колик Л.Г., Гарибова Т.Л., Литвинова С.А. и др. Отсутствие толерантности и синдрома отмены у нового L-триптофансодержащего дипептидного анксиолитика ГБ-115. *Вестник РАМН.* 2011; 7: 37–42.

12. Константинопольский М.А., Чернякова И.В., Кудрин В.С., Клодт П.М., Колик Л.Г., Гудашева Т.А. Дипептидный аналог нейротензина NT(8–13) дилепт повышает болевой порог и снижает выраженность синдрома отмены морфина у крыс. *Эксп. и клин. Фармакол.* 2013; 76: 10: 6–11.

13. Морозов И.С., Пухова Г.С., Авдилов Н.А. и др. Механизмы нейротропного действия бромантана. *Эксп. и клин.фармакол.* 1999; 62: 1: 11–14.

14. Замин И.А., Абаимов Д.А., Будыгин Е.А., Золотарев Ю.А., Ковалев Г.И. Участие дофамин- и серотонинергических систем мозга в реализации психофармакологических эффектов ладастена и сиднокарба. *Экспер. и клин. фармакол.* 2010; 73: 2: 2–5.

15. Freye E., Latasch L. Development of opioid tolerance — molecular mechanisms and clinical consequences. *Anesthesiol Intensivmed Notfallmed Schmerzther.* 2003 Jan; 38 (1): 14–26.

16. Bujak-Giżycka B., Kącka K., Suski M. et al. Beneficial effect of amantadine on postoperative pain reduction and consumption of morphine in patients subjected to elective spine surgery. *Pain Med.* 2012; 13: 3: 459–65.

17. Колик Л.Г., Жуков В.Н., Середенин С.Б. Влияние соединения ГБ-115 на индуцированную морфином анальгезию. *Бюлл.Экспер. биол. и мед.* 2007; 143: 6: 645–647.

18. Kolik L.G., Gudasheva T.A., Seredenin S.B. Dipeptide anxiolytic GB-115: new receptor targets. *European Neuropsychopharmacology.* 2011; 21: S2: S146.

19. Xiong W., Yu L.C. Involvement of endogenous cholecystokinin in tolerance to morphine antinociception in the nucleus accumbens of rats. *Behav Brain Res.* 2006; 173: 1: 116–21.

20. Xie J.Y., Herman D.S., Stiller C.O. et al. Cholecystokinin in the rostral ventromedial medullamediates opioid-induced hyperalgesia and antinociceptive tolerance. *J Neurosci.* 2005; 25: 2: 409–16.

21. Agnes R.S., Ying J., Kövér K.E. et al. Structure-activity relationships of bifunctional cyclic disulfide peptides based on overlapping pharmacophores at opioid and cholecystokinin receptors. *Peptides.* 2008; 29: 8: 1413–23.