

## СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИЗУЧЕНИЕ ФИЗИЧЕСКОЙ ЗАВИСИМОСТИ К ПРОЛИНОВОМУ АНАЛОГУ ДЕРМОРФИНА И МОРФИНУ

Л. С. Гузевых<sup>1</sup>, Д. В. Валуйских<sup>1</sup>, Т. А. Воронина<sup>1</sup>, Т. Г. Емельянова<sup>2</sup>,  
Л. А. Андреева<sup>3</sup>, Л. Ю. Алфеева<sup>3</sup>, Н. Ф. Мясоедов<sup>3</sup>

При моделировании острой физической зависимости [D-Pro<sup>6</sup>]ДМ-зависимые животные реагировали на провокацию налоксоном тремором, встряхиваниями, корчами, редкими прыжками, характерными для морфин-зависимых животных. Разнообразие реакций и их интенсивность зависели от дозы налоксона и интервала между инъекциями налоксона и пептида. При провокации синдрома отмены после субхронического введения по одной схеме в одинаковых дозах пептида и морфина, симптомы синдрома у [D-Pro<sup>6</sup>]ДМ-зависимых животных были значительно менее выражены, чем у морфин-зависимых животных.

**Ключевые слова:** морфин, пептиды, синдром отмены

### ВВЕДЕНИЕ

Опиоидные пептиды — дерморфины (ДМ), выделенные из кожи южноамериканской лягушки семейства *Phyllomedusinae*, являются наиболее активными анальгетиками среди известных природных пептидов [7, 10, 13]. При спинальном введении грызунам ДМ в 500 раз активнее морфина (при аналогичном способе введения) в тестах горячей пластины, отдергивания хвоста и “корчей” [12]. В исследованиях на людях ДМ в 100 раз превосходит по активности морфин [2]. Для ДМ-подобных пептидов характерно более медленное развитие толерантности, чем для морфина [3, 5] и менее выраженный синдром отмены [8, 9, 11].

Ранее нами показано, что замена аминокислотного остатка пролина (L-Pro<sup>6</sup>) в шестом положении молекулы ДМ на его D-изомер (D-Pro<sup>6</sup>) приводит к значительному усилению анальгетической активности [1, 4]. В частности, минимальная доза [D-Pro<sup>6</sup>]ДМ, вызывающая анальгетический эффект, в 10 раз меньше, чем у ДМ. Целью настоящей работы явилось сравнительное изучение симптомов физической зависимости аналога ДМ — [DPro<sup>6</sup>]ДМ и морфина.

### МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследования проводили на самцах беспородных белых мышей массой 20 – 25 г. Всего было использовано 350 мышей, в каждой группе по 12 – 20 животных. Вещества вводили из расчета 1 мл на 100 г массы тела. [DPro<sup>6</sup>]ДМ синтезирован в Институте молеку-

лярной генетики РАН под руководством Н. Ф. Мясоедова.

Исследовали острую физическую зависимость в двух вариантах опытов по методу [5] и зависимость при субхроническом введении веществ по методу [6]. Во всех экспериментах, кроме оговоренных отдельно, симптомы физической зависимости провоцировали налоксоном (10 мг/кг, под кожу). [DPro<sup>6</sup>]ДМ и морфин вводили внутривенно. Вещества растворяли в дистиллированной воде.

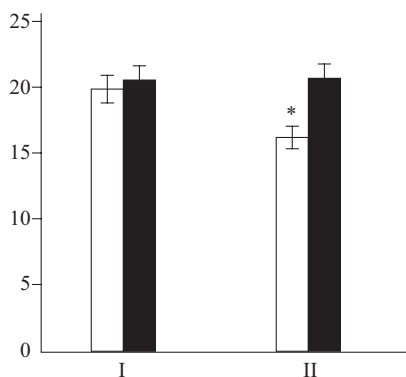
*Острая зависимость* [5]. В первом эксперименте животных разделили на восемь групп по 12 мышей. Четверем контрольным группам вводили дистиллированную воду – серия контроля. Четверем экспериментальным группам вводили [DPro<sup>6</sup>]ДМ в дозе 100 мг/кг — серия опыта. Синдром отмены провоцировали введением налоксона через разные интервалы времени. Мышам первой группы контрольной и опытной серий налоксон вводили через 1 ч после инъекции [DPro<sup>6</sup>]ДМ. Животным второй, третьей и четвертой групп контрольной и опытной серий — через 3, 5 и 7 ч после инъекции [DPro<sup>6</sup>]ДМ, соответственно. Во втором эксперименте животных также разделили на восемь групп по 12 мышей. Четверем контрольным группам вводили дистиллированную воду — серия контроля. Четверем экспериментальным группам вводили [DPro<sup>6</sup>]ДМ в дозе 100 мг/кг — серия опыта. Синдром отмены провоцировали разными дозами налоксона через 3 ч после введения [DPro<sup>6</sup>]ДМ. Мышам первой группы контрольной и опытной серий налоксон вводили в дозе 1 мг/кг. Животным второй, третьей и четвертой групп контрольной и опытной серий вводили налоксон в дозах 5, 10 и 20 мг/кг, соответственно.

*Физическая зависимость после субхронического введения веществ* [6]. Животных разделили на четыре группы по 20 мышей в каждой. Двум группам мышей вводили дистиллированную воду, третьей — [DPro<sup>6</sup>]ДМ, четвертой — морфин. Инъекции проводили два раза в день — в 10 и 16 ч. В первый день веще-

<sup>1</sup> Лаборатория психофармакологии (зав. — проф. Т. А. Воронина) ГУ НИИ фармакологии им. В. В. Закусова РАМН, Москва, 125315, ул. Балтийская, 8.

<sup>2</sup> Лаборатория структурной организации биологических систем (зав. — проф. А. В. Шишков) Институт химической физики им. Н. Н. Семенова РАН, Москва, 119991, ул. Косыгина, 4.

<sup>3</sup> Сектор регуляторных пептидов (зав. — Л. А. Андреева) Институт молекулярной генетики РАН, Москва, 123182, пл. Курчатова, 2.



Вызванное налоксоном (10 мг/кг, под кожу) изменение массы мышцей после хронического введения морфина и [DPro<sup>6</sup>]ДМ по схеме 3 × 50 мг/кг, 3 × 75 мг/кг, 3 × 100 мг/кг в течение 5 дней.

По оси абсцисс: I — масса мышцей на 5 день до введения налоксона, II — масса мышцей на 5 день через 2 ч после введения налоксона; по оси ординат — изменение массы, г. Светлые столбики — морфин, темные — [DPro<sup>6</sup>]ДМ. Отличия достоверны ( $p < 0,05$ ): \* — от 1 дня введения; # — от массы мышцей до введения налоксона.

ства вводили в дозе 50 мг/кг. На 2-й день в 10 ч вещества вводили в дозе 50 мг/кг, в 16 ч — в дозе 75 мг/кг. На 3-й день — в дозе 75 мг/кг. На 4-й и 5-й день — в дозе 100 мг/кг. На 5-й день в 16 ч трем группам вводили налоксон, а первой контрольной — воду.

Во всех экспериментах регистрировали число прыжков, корчей, встряхиваний, тремора в виде “барабанного боя”, птоз на протяжении одного часа после инъекции налоксона.

Результаты исследований обрабатывали статистически при помощи непараметрического критерия Вилкоксона — Манна — Уитни, используя пакет программ Microsoft Excel 2002.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

### Острая физическая зависимость

1. Эксперимент с введением налоксона через разные интервалы времени после [DPro<sup>6</sup>]ДМ. В контрольных группах, получавших налоксон после воды, и получавших воду после [DPro<sup>6</sup>]ДМ симптомов физической зависимости не наблюдали. Введение налоксона после [DPro<sup>6</sup>]ДМ вызывает разнообразные реакции:

тремор, стук зубами, корчи, встряхивания “мокрой собаки”. Установлено, что при введении налоксона через 1 ч после [DPro<sup>6</sup>]ДМ описанные выше проявления синдрома отмены появлялись только через 40 мин наблюдения (табл. 1). Введение налоксона через 3 ч после пептида приводило к более быстрому развитию разнообразных реакций: прыжков, характерных для морфинзависимых животных, тремора, стука зубами, корчей и встряхиваний “мокрой собаки”. При этом прыжковая активность наблюдалась только первые 20 мин наблюдений. Введение налоксона через 5 ч после пептида приводило к уменьшению видового разнообразия реакций: наблюдался только тремор, корчи и встряхивания. Дальнейшее увеличение интервала времени между инъекциями пептида и налоксона до 7 ч приводило к еще большему “обеднению” синдрома отмены — у животных отмечались только тремор и встряхивания. Таким образом, наиболее выраженными и разнообразными оказались проявления синдрома отмены при их провокации налоксоном через 3 ч после пептида. Уменьшение или увеличение интервала между применением пептида и налоксона приводит к ослаблению симптомов. В связи с этим именно 3-часовой интервал был выбран для дальнейших исследований.

2. Эксперимент с введением разных доз налоксона через 3 ч после [DPro<sup>6</sup>]ДМ. Как и в предыдущем эксперименте в серии контрольных животных, получивших налоксон в дозах 1, 5, 10 и 20 мг/кг после воды, симптомов физической зависимости не наблюдалось. У животных опытной серии, получивших налоксон после [DPro<sup>6</sup>]ДМ, наблюдаются признаки синдрома отмены. Установлено, что в дозе 1 мг/кг налоксон провоцирует только тремор и встряхивания; прыжковой активности не наблюдалось. При увеличении дозы налоксона до 5 мг/кг картина синдрома отмены дополнялась появлением прыжков и стука зубами. При увеличении дозы налоксона до 10 и особенно 20 мг/кг процент животных, реагирующих прыжками, дозозависимо увеличивался и достигал 30 %. При этом подобная реакция наблюдалась только первые 20 мин наблюдения. Тремор наблюдался у всех животных; одна-

Таблица 1. Среднее число реакций и процент животных с признаками синдрома отмены при провокации налоксоном в дозе 10 мг/кг через 1, 3, 5 и 7 ч после введения [DPro<sup>6</sup>]ДМ в дозе 100 мг/кг

Налоксон	0 – 20 мин					20 – 40 мин					40 – 60 мин				
	I	II	III	IV	V	I	II	III	IV	V	I	II	III	IV	V
1 ч	%	0	0	0	0	0	0	0	0	17	0	83	33	17	67
	число	0	0	0	0	0	0	0	0	0,2 ± 0,2	0	9,0 ± 5,6	0,5 ± 0,3	0,2 ± 0,2	0,83 ± 0,3
3 ч	%	25	100	33	33	0	0	100	33	0	17	0	50	33	17
	число	0,6 ± 0,5	6,7 ± 1,4	0,5 ± 0,3	0,8 ± 0,7	0	0	12,7 ± 5,3	0,7 ± 0,5	0	0,2 ± 0,2	0	2,67 ± 1,4	0,5 ± 0,3	0,2 ± 0,2
5 ч	%	0	100	50	0	0	0	83	0	0	0	0	33	0	17
	число	0	5,3 ± 1,0	0,7 ± 0,3	0	0	0	3,0 ± 1,3	0	0	0	0	5,7 ± 3,6	0	0,2 ± 0,2
7 ч	%	0	17	0	0	0	0	50	0	0	0	0	50	17	0
	число	0	0,3 ± 0,3	0	0	0	0	0,8 ± 0,4	0	0	0	0	3,8 ± 2,7	0,2 ± 0,2	0

**Примечание.** Здесь и в табл. 2 и 3: I — прыжки; II — тремор (“барабанный бой”); III — встряхивания; IV — корчи; V — стук зубами. % — процент животных с соответствующей реакцией. Число — среднее количество реакций в группе.

Таблица 2. Среднее число реакций и процент животных с признаками синдрома отмены при провокации налоксоном в дозах 1, 5, 10 и 20 мг/кг через 3 ч после введения [DPro<sup>6</sup>]ДМ в дозе 100 мг/кг

Налоксон	0 – 20 мин					20 – 40 мин					40 – 60 мин				
	I	II	III	IV	V	I	II	III	IV	V	I	II	III	IV	V
1 ч	%	0	67	17	0	0	67	17	0	0	0	50	0	0	0
	число	0	4,1 ± 1,8	0,2 ± 0,2	0	0	3,17 ± 1,3	0,3 ± 0,2	0	0	0	2,0 ± 1,0	0	0	0
5 ч	%	17	100	33	0	0	50	0	0	33	0	50	17	0	0
	число	0,3 ± 0,3	16,0 ± 7,3	0,3 ± 0,2	0	0	8,2 ± 4,3	0	0	0,5 ± 0,3	0	7,0 ± 4,8	0,2 ± 0,2	0	0
10 ч	%	25	100	33	33	0	100	33	0	17	0	50	33	17	33
	число	0,6 ± 0,5	6,7 ± 1,4	0,5 ± 0,3	0,8 ± 0,7	0	12,7 ± 5,3	0,7 ± 0,5	0	0,2 ± 0,2	0	2,67 ± 1,4	0,5 ± 0,3	0,2 ± 0,2	0,3 ± 0,2
20 ч	%	33	100	0	0	0	100	17	0	50	0	100	17	17	0
	число	0,8 ± 0,7	14,2 ± 4,3	0	0	0	4,0 ± 2,5	0,2 ± 0,2	0	8,0 ± 6,1	0	8,0 ± 2,7	0,2 ± 0,2	0,2 ± 0,2	0

ко его интенсивность и продолжительность зависели от дозы налоксона. При введении налоксона в дозе 10 мг/кг тремор наблюдался у 100 % животных только первые 40 мин наблюдения, а при введении налоксона в дозе 20 мг/кг тремор регистрировали у всех животных на протяжении 60 мин наблюдения (табл. 2).

Введение налоксона после однократной инъекции морфина в дозе 100 мг/кг приводит к появлению прыжковой реакции, которая считается основным компонентом синдрома отмены у морфинзависимых животных [8]. Картина развития синдрома отмены [DPro<sup>6</sup>]ДМ отличается от описанной выше реакции на отмену морфина. Характерным проявлением синдрома отмены для [DPro<sup>6</sup>]ДМ является тремор. Тремор у всех животных развивается при провокации налоксоном в дозе 5 мг/кг и более через 3 и 5 ч после введения пептида. Прыжковая активность, характерная для морфинзависимых животных, развивается у [DPro<sup>6</sup>]ДМ-зависимых животных только при введении налоксона через 3 ч. Эффект зависит от дозы налоксона. Следует особо отметить, что максимальное проявление прыжковой активности регистрируется после введения налоксона в дозе 20 мг/кг, однако при этом среднее количество прыжков за 20 мин наблюдения составило всего 0,83. В аналогичных условиях проведения эксперимента у морфинзависимых животных регистрировалось в 20 раз больше количество прыжков за 5 мин наблюдения [5].

#### Физическая зависимость после субхронического введения веществ

В контрольных группах животных, получавших только воду или одну инъекцию налоксона после суб-

хронического введения воды, симптомов физической зависимости не наблюдалось. Сравнение тяжести синдрома отмены при субхроническом введении [DPro<sup>6</sup>]ДМ и морфина показало, что у [DPro<sup>6</sup>]ДМ-зависимых животных первые 20 мин наблюдений было достоверно меньше прыжков, тремора и встряхиваний (табл. 3). Так, только у 24 % [DPro<sup>6</sup>]ДМ-зависимых животных регистрировали прыжки, у 12 % — встряхивания и у 71 % — тремор. В группе морфинзависимых животных отмечали прыжки и тремор у 94 % мышей и встряхивания — у 41 %. В последующие интервалы наблюдений количество реакций в обеих группах постепенно уменьшалось, однако, различия между группами сохраняли достоверную значимость. Реакции в виде стука зубами, корчей и птоза не появлялись ни у морфинзависимых, ни у [DPro<sup>6</sup>]ДМ-зависимых животных.

Через 2 ч после инъекции налоксона у животных регистрировали массу тела. Показано, что мышцы, которым вводили морфин, достоверно теряли в весе, в отличие от животных, которым вводили [DPro<sup>6</sup>]ДМ (рисунок), что также свидетельствует о более мягком течении синдрома отмены [DPro<sup>6</sup>]ДМ по сравнению с морфином.

Таким образом, при моделировании синдрома отмены субхроническим введением [DPro<sup>6</sup>]ДМ и морфина по одной схеме и в одних и тех же концентрациях, у [DPro<sup>6</sup>]ДМ-зависимых животных синдром отмены был менее выражен. При субхроническом введении пептида животные не теряли в массе, в отличие от животных, которым вводили морфин.

Таблица 3. Процент животных с признаками синдрома отмены и среднее число реакций при провокации налоксоном в дозе 5 мг/кг после хронического введения [DPro<sup>6</sup>]ДМ и морфина по схеме: 3 × 50 мг/кг, 3 × 75 мг/кг, 3 × 100 мг/кг в течение 5 дней по 2 инъекции в день

Налоксон	0 – 20 мин			20 – 40 мин			40 – 60 мин			
	I	II	III	I	II	III	I	II	III	
Морфин	%	94	94	41	76	71	12	53	47	12
	число	20,47 ± 5,48	14,24 ± 5,37	0,53 ± 0,19	7,71 ± 1,95	7,12 ± 1,71	0,24 ± 0,16	4,76 ± 1,41	3,0 ± 1,02	0,12 ± 0,08
[DPro <sup>6</sup> ]- ДМ	%	24*	71	12*	35*	47	6	35	41	6
	число	1,35 ± 1,02*	2,88 ± 0,98*	0,12 ± 0,08	4,47 ± 3,24*	1,88 ± 0,70	0,06 ± 0,06	8,29 ± 5,62	1,06 ± 0,37	0,06 ± 0,06

Примечание. \* – отличия достоверны от группы морфинзависимых животных при  $p < 0,05$ .

## ВЫВОДЫ

1. В условиях модели острой физической зависимости, провоцируемой налоксоном, деморфин (ДМ) вызывает нарушения поведения, которые качественно и количественно отличаются от проявлений, вызываемых морфином. В противоположность морфину, для которого характерна выраженная прыжковая активность, ДМ в комбинации с налоксоном вызывает главным образом тремор (“барабанный бой”) и только через определенный интервал (3 ч) после введения налоксона наблюдаются единичные прыжки.

2. На модели физической зависимости, провоцируемой налоксоном после субхронического введения, у [D-Pro<sup>6</sup>]ДМ-зависимых животных проявления синдрома отмены были значительно менее выраженными, чем у морфинзависимых животных. У ДМ-зависимых животных не отмечались изменения массы тела, наблюдались только единичные прыжки, тогда как у морфинзависимых животных масса тела существенно снижалась, а число прыжков было в 20 раз больше.

Работа выполнена при поддержке Регионального общественного фонда содействия отечественной медицине и Программы фундаментальных исследований Президиума РАН “Молекулярная и клеточная биология”.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Л. С. Гузеватых, Т. Г. Емельянова, А. Б. Усенко и др., *Изв. АН Сер. биол.*, № 4, 472 – 476 (2002).
2. N. Basso, M. Marcelli, A. Ginaldi, et al., *Peptides*, **6**, suppl. 3, 177 – 179 (1985).
3. M. Broccardo, G. Improta, and L. Negri, *Eur. J. Pharmacol.*, **110**(1), 55 – 61 (1985).
4. M. Broccardo, A. B. Usenko, M. G. Uranova, et al., *Peptides*, **24**(3), 419 – 428 (2003).
5. K. Chaki, S. Sakurada, T. Sakurada, et al., *Neuropeptides*, **13**(2), 83 – 88 (1989).
6. M. Fernandes, S. Kluwe, and H. Coper, *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.*, **297**, 53 – 60 (1977).
7. P. Melchiorri and L. Negri, *Gen. Pharmacol.*, **27**(7), 1099 – 1107 (1996).
8. N. Nakata, S. Sakurada, T. Sakurada, et al., *Pharmacol. Biochem. Behav.*, **24**(1), 27 – 31 (1986).
9. L. Negri, R. Lattanzi, and P. Melchiorri, *Br. J. Pharmacol.*, **114**(1), 57 – 66 (1995).
10. L. Negri, P. Melchiorri, and R. Lattanzi, *Peptides*, **21**(11), 1639 – 1647 (2000).
11. P. Riba, Y. Ben, and T. M. Nguyen, *Curr. Med. Chem.*, **9**(1), 31 – 39 (2002).
12. C. W. Stevens and T. L. Yaksh, *Brain Res*, **385**(2), 300 – 304 (1986).
13. S. Vonhof, B. D. Gudka and A. L. Siren, *Eur. J. Pharmacol.*, **459**(1), 41 – 48 (2003).

Поступила 26.04.04

## COMPARATIVE STUDY OF THE PHYSICAL DEPENDENCE ON PROLINE ANALOG OF DERMORPHIN AND MORPHINE

L. S. Guzevatykh<sup>1</sup>, D. V. Valuiskikh<sup>1</sup>, T. A. Voronina<sup>1</sup>, T. G. Emel'yanova<sup>2</sup>,  
L. A. Andreeva<sup>3</sup>, L. Yu. Alfeeva<sup>3</sup>, and N. F. Myasoedov<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Laboratory of Psychopharmacology, Zakusov Institute of Pharmacology, Russian Academy of Medical Sciences, Baltiiskaya ul. 8, Moscow, 125315 Russia

<sup>2</sup> Laboratory of Structural Organization of Biological systems, Semenov Institute of Chemical Physics, Russian Academy of Sciences, ul. Kosygina 4, Moscow, 119991 Russia

<sup>3</sup> Department of Regulatory Peptides, Institute of Molecular Genetics, Russian Academy of Sciences, pl. Kurchatova 2, Moscow, 123182 Russia

On the model of acute physical dependence, naloxone treatment of animals dependent on D-Pro<sup>6</sup> peptide ([D-Pro<sup>6</sup>]DM) (a demorphin analog) led to tremor, shaking, convulsions, and rare jumps typical of morphine-dependent animals. The variety and intensity of reactions depended on the naloxone dose and the interval between naloxone and peptide injections. In the state of reject syndrome upon peptide and morphine subchronic treatments according to identical schedules, the symptoms in [D-Pro<sup>6</sup>]DM dependent animals were much less pronounced than in morphine-dependent ones.